

# Dissertation

der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller- Universität Jena



---

seit 1548

## **Der Einfluss von EphrinA5 auf die Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen während der embryonalen Neurogenese**

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller- Universität Jena

Von

Diplom Biologin Katrin Gerstmann  
geboren am 20.02.1986 in Eisenach

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Jürgen Bolz  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Lennart Olsson  
Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie  
Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 3. Gutachter:** PD Dr. Karl-Friedrich Schmidt  
Systems Neuroscience Group  
Georg-August-Universität Göttingen

**Tag der Disputation:** 17. März 2014

„Das Staunen ist der Anfang der Erkenntnis.“

*Platon, griechischer Philosoph (427 v.Chr. -347 v.Chr.)*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Entwicklung des Neokortex .....	1
1.1.1 Die Organisation der Großhirnrinde .....	1
1.1.2 Die ontogenetische Entwicklung des Neokortex .....	2
1.1.3 Radiale Migration .....	5
1.2 Organisation und Entwicklung des Thalamus .....	6
1.3 Das Eph/Ephrin-System .....	7
1.3.1 Aufbau und Funktion von Ephrinen und Eph-Rezeptoren .....	7
1.3.2 Interaktionen und Signaltransduktion von Eph-Rezeptoren und Ephrinen .....	9
 <b>2 Zielstellung .....</b>	 <b>11</b>
2.1 Vergleichende Charakterisierung der Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen in EphrinA5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren .....	11
2.2 Identifizierung des Effekt-vermittelnden Rezeptors .....	11
2.3 Charakterisierung des Mechanismus der Rezeptor/Liganden-Bindung .....	12
 <b>3 Material und Methoden .....</b>	 <b>13</b>
3.1 Verwendete Organismen .....	13
3.1.1 Versuchstiere, Haltung und Verpaarung .....	13
3.1.2 Wirtsbakterien .....	13
3.2 Zellbiologische Methoden .....	13
3.2.1 Beschichten der Deckgläschen mit homogenem Substrat .....	14
3.2.2 Organentnahme und Präparation von Gehirngewebe .....	14
3.2.3 Herstellung und Kultivierung kortikaler Einzelzellen .....	14
3.2.4 Pair-cell Assay .....	15
3.2.5 Anfertigung organotypischer Schnittkulturen .....	15
3.2.6 Kultivierung thalamischer Explantate .....	16
3.2.7 Stimulation mit rekombinanten Proteinen .....	16
3.2.8 Nukleinsäurefärbung mit Syto14® .....	16
3.3 Immunhistochemische Methoden .....	17
3.3.1 Injektion von BrdU .....	17



3.3.2 Perfusion postnataler Versuchstiere.....	17
3.3.3 Herstellung von Gefrierschnitten.....	17
3.3.4 Immunhistochemische Markierung.....	18
3.3.5 Dil Tracing-Experimente.....	19
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	19
3.4.1 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	20
3.4.2 Qualitative und Quantitative Analyse von Nukleinsäuren.....	21
3.4.3 Modifikation von Nukleinsäuren.....	22
3.4.5 Synthese von Nukleinsäuren.....	23
3.4.6 In situ Hybridisierung an Gefrierschnitten.....	24
3.4.7 Herstellung von cDNA-Bibliotheken aus Einzelzellen und Axonen.....	27
3.4.8 Mikroskopie und statistische Auswertung.....	28
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1 Adulte EphrinA5-defiziente Mäuse weisen eine persistente Verschiebung der laminaren Organisation auf .....	30
4.2 EphrinA5-defiziente Mäuse weisen eine veränderte Anzahl postmitotischer Neurone während der Bildung der infragranulären und supragranulären Schichten auf .....	32
4.3 EphrinA5 reguliert die Anzahl und Identität von apikalen und basalen Vorläuferzellen.....	34
4.4 EphrinA5 beeinflusst die Teilungssymmetrie apikaler Vorläuferzellen und dadurch die Identität der generierten Tochterzellen.....	36
4.6 Die Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen wird über EphrinA5/EphA4 Interaktionen beeinflusst .....	41
4.7 EphA4 ist auf den basalen Fortsätzen radialer Gliazellen lokalisiert .....	43
4.8 EphrinA5 konnte weder in proliferativen, noch in postmitotischen kortikalen Zellen detektiert werden.....	46
4.9 Die proliferativen Effekte in EphrinA5-defizienten Mäusen werden nicht durch Unterschiede in der Invasion kortikaler Interneurone verursacht.....	47
4.10 Thalamische Afferenzen importieren extrakortikales EphrinA5 in den sich entwickelnden Neokortex .....	50
4.11 Ektopisches EphrinA5-Fc in der kortikalen Platte und Intermediärzone beeinflusst die Identität der kortikalen Vorläuferzellen.....	55

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>58</b>
5.1 Ephrine beeinflussen die mitotische Aktivität kortikaler Vorläuferzellen .....	58
5.2 EphA4/EphrinA5-Interaktionen regulieren die Balance von Proliferation und Differenzierung .....	60
5.3 Radiale Gliazellen dienen als strukturelle Verbindung der embryonalen Zonen.....	62
5.4 Kortikale Vorläuferzellen und laminare Identität .....	63
5.5 Die Relevanz der Teilungssymmetrie für die Anzahl und Identität kortikaler Vorläuferzellen und postmitotischer Neurone .....	66
5.7 Die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen wird durch einwachsende thalamische Afferenzen reguliert.....	68
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>7 Abstract.....</b>	<b>73</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>90</b>
9.1 Abkürzungsverzeichnis .....	90
9.2 Verwendete Materialien .....	92
9.2.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und andere Hilfsmittel.....	92
9.2.2 Verwendete Antikörper .....	95
9.2.3 Verwendete Primer und mRNA-Sonden .....	96
9.2.4 Medien, Puffer und Stammlösungen .....	98
9.5 Eidesstattliche Erklärung.....	102
9.6 Danksagung .....	103
9.7 Lebenslauf .....	105
9.8 Publikationsliste .....	106
9.6.1 Fachartikel .....	106
9.6.2 Nicht begutachtete Veröffentlichungen .....	107

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die kortikalen Schichten werden nach dem <i>inside-out</i> Prinzip gebildet. ....	3
Abbildung 2: Radiale Gliazellen generieren kortikale Vorläuferzellen und postmitotische Neurone .....	5
Abbildung 3: Schematischer Aufbau von Eph-Rezeptoren und Ephrinen. ....	8
Abbildung 4: Sequenzhomologien und Bindungspräferenzen von Eph-Rezeptoren und Ephrinen. ....	9
Abbildung 5: EphrinA5-Defizienz verursacht eine persistente Verschiebung der adulten kortikalen Organisation.....	31
Abbildung 6: EphrinA5-defiziente Mäuse produzieren an E13,5 eine erhöhte Anzahl postmitotischer Neurone, während sie an E16,5 eine verringerte Austrittsrate aus dem Zellzyklus aufweisen .....	33
Abbildung 7: EphrinA5 reguliert die Anzahl und Identität kortikaler Vorläuferzellen.....	36
Abbildung 8: Die Anzahl asymmetrisch proliferierender apikaler Vorläuferzellen ist in EphrinA5-defizienten Mäuse erhöht.....	38
Abbildung 9: Die Stimulation kortikaler Vorläuferzellen mit rekombinantem EphrinA5-Fc an E13,5 erhöht den Anteil der sich proliferativ teilenden Vorläuferzellen .....	39
Abbildung 10: Die symmetrische, terminale Teilung ist in EphrinA5-defizienten Mäusen an E16,5 reduziert.....	41
Abbildung 11: EphA4 wird in den transienten, proliferativen Zonen des embryonalen Kortex exprimiert.....	42
Abbildung 12: EphA4-Defizient verursacht eine persistente Verschiebung der kortikalen Schichten ....	43
Abbildung 13: EphA4 wird von radialen Gliazellen exprimiert und ist in der Zellmembran entlang der glialen Fortsätze lokalisiert. ....	44
Abbildung 14: EphrinA5 wird weder von proliferativen, noch von postmitotischen kortikalen Zellen exprimiert.....	47
Abbildung 15: Es gibt keine Unterschiede in der Invasion kortikaler Interneurone in den Neokortex von EphrinA5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren.....	49
Abbildung 16: An E13,5 erreichen die ersten Pionieraxone aus dem Thalamus, wo auch EphrinA5 exprimiert wird, den sich entwickelnden Kortex .....	51
Abbildung 17: EphrinA-Liganden sind entlang thalamischer Axone lokalisiert. ....	53
Abbildung 18: Thalamische Axone weisen EphrinA5-mRNA auf .....	54
Abbildung 19: Ektopisches EphrinA5 in der CP/IMZ ist ausreichend um die EphA4-vermittelten proliferativen Effekte zu induzieren.....	56

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Quantifizierung der Teilungssymmetrie apikaler Vorläuferzellen .....	37
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.....	92
Tabelle 3: Liste der verwendeten Materialien .....	92
Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien .....	93
Tabelle 5: Liste der verwendeten rekombinanten Proteine. ....	94
Tabelle 6: Liste der verwendeten primären Antikörper.....	95
Tabelle 7: Liste der verwendeten sekundären Antikörper .....	95
Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer .....	96
Tabelle 9: Liste aller verwendeten Sonden .....	96
Tabelle 10: Liste der verwendeten Sonden.....	97

## **1 Einleitung**

Während der embryonalen Gehirnentwicklung generieren undifferenzierte Vorläuferzellen eine Vielzahl morphologisch und funktionell unterschiedlicher Neurone. Dabei existiert im Kortex ein diskretes Verhältnis von 80 % exzitatorischer Projektionsneurone und 20 % inhibitorischer Interneurone. Während kortikale Interneurone im ventralen Telenzephalon in den ganglionischen Eminenzen generiert werden und anschließend über weite Strecken tangential in den dorsalen Kortex einwandern (de Carlos et al., 1996; Marin and Rubenstein, 2001; Tamamaki et al., 1997), erfolgt die Bildung der exzitatorischen Projektionsneurone in den proliferativen Zonen des dorsalen Telenzephalons (Götz and Huttner, 2005; Merot et al., 2009; Polleux et al., 1997; Takahashi et al., 1996).

Um die korrekte Anzahl, Lokalisation und Konnektivität der Neurone zu gewährleisten, sind präzise, entwicklungsrelevante Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration, Axonbildung und Synaptogenese erforderlich. Zahlreiche intrinsische und extrinsische Faktoren sind in die Regulation der embryonalen Entwicklungsprozesse involviert und sind daher zunehmend Gegenstand der neurobiologischen Forschung. Die vorliegende Arbeit behandelt den Einfluss des Signalmoleküls EphrinA5 auf die Proliferation und Differenzierung kortikaler Vorläuferzellen während der embryonalen Neurogenese und dessen Bedeutung für die laminare Organisation des Neokortex.

### **1.1 Aufbau und Entwicklung des Neokortex**

#### **1.1.1 Die Organisation der Großhirnrinde**

Der Neokortex der Säugetiere ist in Areale, horizontale Schichten und radiale Säulen organisiert. Die Aufteilung in Areale erfolgt aufgrund der zytoarchitektonischen Zusammensetzung und Funktionalität. Die sechs horizontalen Schichten des Neokortex unterscheiden sich durch ihre spezifische zelluläre Zusammensetzung, Packungsdichte und Konnektivität. Die Neurone der einzelnen Schichten weisen charakteristische morphologische und funktionelle Eigenschaften auf und jede Schicht bildet spezifische intrinsische und extrinsische Verknüpfungen. Radial zur Kortexoberfläche verlaufende, intrinsische Projektionen verbinden die Schichten innerhalb eines Areals. So verzweigen sich Projektionsneurone aus Schicht 6 in Schicht 4, jedoch nicht in Schicht 5. Dagegen bilden Nervenzellen aus Schicht 2/3 Synapsen in Schicht 2/3 und 5, aber nicht in Schicht 4 und 6 aus (Garey and Powell, 1971; Lund and Mustari, 1977). Projektionen zu anderen kortikalen und subkortikalen Arealen werden als extrinsische Verbindungen bezeichnet. Man unterscheidet in eingehende Afferenzen und ausgehende Efferenzen. So terminieren thalamo-kortikale Afferenzen in Schicht 4 (Götz and Bolz, 1992), während kortiko-fugale Efferenzen von

Schicht 6 ausgehen. Außerdem bildet die Schicht 2/3 kortiko-kortikale Kontakte zu ipsi- und kontralateralen Arealen aus (Bolz and Gilbert, 1989; Gilbert and Kelly, 1975).

Zusätzlich zum laminaren Aufbau ist der Kortex in vertikalen Kolumnen organisiert (Mountcastle, 1997). Neurone einer kortikalen Säule antworten auf gleiche Reizparameter, wie beispielsweise auf Farbe und Orientierung eines Lichtreizes im visuellen Kortex (Hubel and Wiesel, 1962). Es wurde gezeigt, dass Neurone innerhalb einer Kolumne von derselben kortikalen Vorläuferzelle abstammen und während der radialen Migration dieselbe Wegstrecke in die kortikale Platte zurücklegen (Kornack and Rakic, 1998; Reid et al., 1995; Torii et al., 2009). Neurone die zum selben Zeitpunkt gebildet werden, befinden sich in den kortikalen Schichten nebeneinander, während Nervenzellen des gleichen Ursprungs in einer radialen Kolumne übereinander lokalisiert sind. Somit spiegelt die Position, Morphologie und Konnektivität eines kortikalen Projektionsneurons seine spezifische Funktion wieder (McConnell, 1995b).

### **1.1.2 Die ontogenetische Entwicklung des Neokortex**

Während der Entwicklung des zerebralen Neokortex sind drei relevante Prozesse maßgeblich erforderlich: Proliferation, Differenzierung und Migration. Alle kortikalen Projektionsneurone gehen aus einem undifferenzierten Neuroepithel (NE), direkt am Ventrikel hervor. Die darin enthaltenen neuronalen Stammzellen weisen eine polarisierte Morphologie auf und werden daher auch als apikale Vorläuferzellen bezeichnet. Sie besitzen einen ventrikulär verankerten apikalen Fortsatz und einen zur Basallamina gerichteten basalen Fortsatz (Fishell and Kriegstein, 2003; Götz and Huttner, 2005; Kriegstein and Götz, 2003). Die neuroepithelialen Vorläuferzellen durchlaufen während des Zellzyklus in der Ventrikularzone (VZ) eine charakteristische, interkinetische Nukleusbewegung. Dabei vollziehen die neuroepithelialen Zellen die S-Phase in der dorsalen VZ und die Mitose direkt am Ventrikel (Chenn and McConnell, 1995; Farkas and Huttner, 2008; Götz and Huttner, 2005). Bevor die ersten Neurone gebildet werden, proliferieren die apikalen Stammzellen symmetrisch (Abbildung 2 A) und vergrößern somit die Population multipotenter Vorläuferzellen (McConnell, 1995a; Rakic, 1995). Es wird vermutet, dass durch diese exponentielle Vergrößerung der Gesamtheit neuroepithelialer Stammzellen die Ausdehnung der Kortexoberfläche determiniert wird (Rakic, 1995, 2005). Die generierten neuroepithelialen Stammzellen beginnen astrogliale Marker zu exprimieren und transformieren in radiale Gliazellen, wobei sie bestimmte Eigenschaften der Neuroepithelzellen, beispielsweise die radiale Ausrichtung, beibehalten (Fishell and Kriegstein, 2003; Götz and Huttner, 2005; Kriegstein and Götz, 2003).

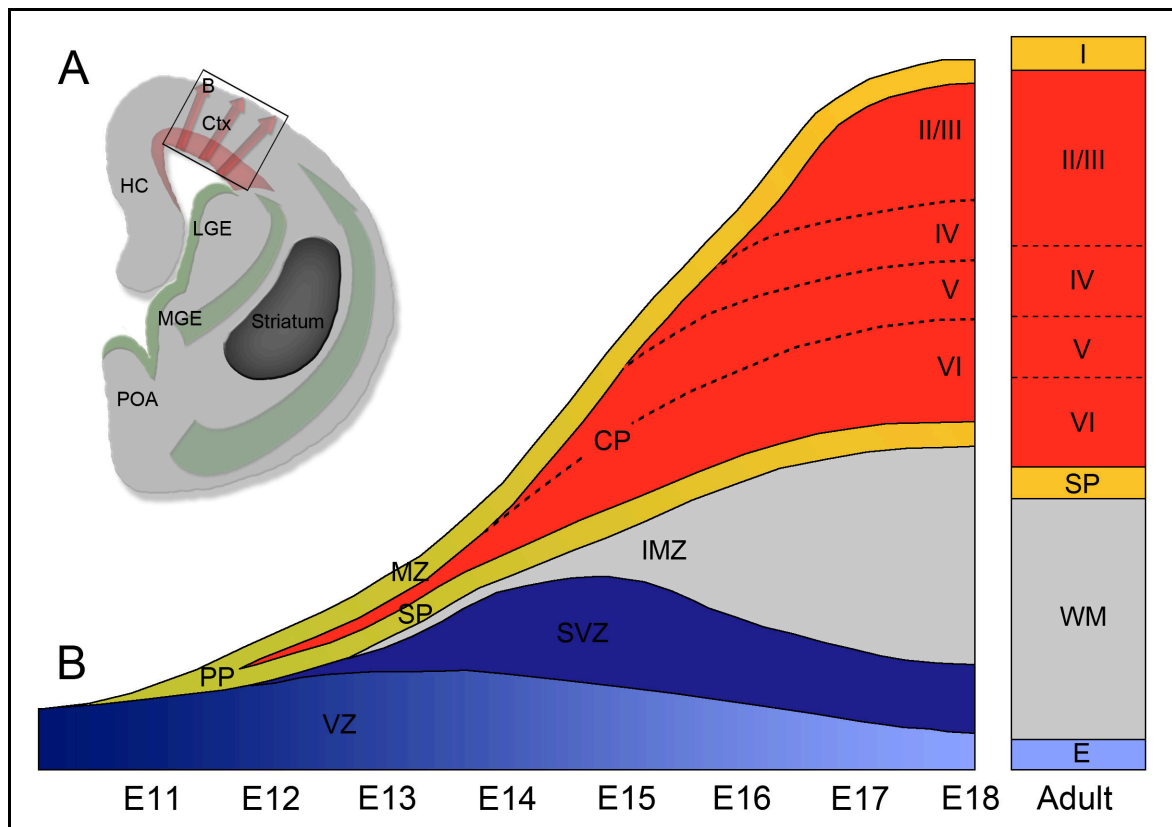


Abbildung 1: Die kortikalen Schichten werden nach dem *inside-out* Prinzip gebildet. Die schematische Darstellung (A) zeigt einen Koronalschnitt einer embryonalen Hemisphäre an E14,5. Die exzitatorischen Projektionsneurone werden in den proliferativen Zonen des dorsalen Telenzephalons generiert und wandern radial in den sich entwickelnden Kortex ein (rote Pfeile). Hingegen werden kortikale Interneurone im basalen Telenzephalon geboren und wandern tangential in den Neokortex (grüne Pfeile). Eine schematische Illustration (B) veranschaulicht die zeitliche Bildung von exzitatorischen Projektionsneuronen durch kortikale Vorläuferzellen aus der VZ und SVZ. Die Neurogenese erfolgt in der Maus von Embryonaltag 12 (E12) bis E18 nach dem *inside-out* Prinzip. Das bedeutet, dass zuerst die tiefen Schichten gebildet werden und nachfolgende Neurone sukzessiv die darüber liegenden kortikalen Schichten besiedeln. CP=kortikale Platte, E=Ependym, IMZ=Intermediärzone, MZ=Marginalzone, PP=Präplatte, SP=Subplatte, SVZ=Subventrikularzone, VZ=Ventrikularzone, WM=Weiße Substanz. Modifiziert nach Merot et al. (2009).

Die Initiation der Neurogenese beginnt mit der Ausbildung der ersten postmitotischen Neurone (Takahashi et al., 1996). In der Maus erstreckt sich die Neurogenese von Embryonaltag 12 (E12) bis E18 (Merot et al., 2009; Polleux et al., 1997), wobei insgesamt 11 Teilungszyklen durchlaufen werden (Kornack and Rakic, 1998). Die ersten postmitotischen Neurone werden zu Beginn der Neurogenese durch asymmetrische Teilungen von apikalen Gliazellen generiert. Die daraus hervorgegangenen Projektionsneurone wandern radial aus der Ventrikularzone aus und bilden darüber die transiente Präplatte (Marin-Padilla, 1971; Rickmann et al., 1977). Nachfolgende exzitatorische Neurone migrieren in die embryonale Präplatte ein und spalten diese in die Marginalzone (spätere Schicht 1) und die Subplatte (spätere Schicht 6b) auf (Aboitiz et al., 2005; Casanova and Trippe, 2006). Anschließend wandern weitere Projektionsneurone zwischen

Marginalzone und Subplatte ein und bilden dort die kortikale Platte (CP), welche später die laminaren Schichten 2 bis 4 umfasst.

Der Neokortex entsteht nach dem *inside-out* Prinzip (Abbildung 1), wonach Neurone, die zur frühen Neurogenese geboren werden, die infragranulären Schichten besiedeln, während später generierte Nervenzellen sukzessiv die darüber liegenden Schichten ausbilden (Angevine and Sidman, 1961; McConnell, 1989; Polleux et al., 1997; Rakic, 1971). Somit wird zuerst die Schicht 6 generiert und zuletzt Schicht 2. Der Bildungszeitpunkt eines Neurons determiniert demnach die spätere Lage und Funktion in den kortikalen Schichten. Zwischen den proliferativen Zonen und der kortikalen Platte entsteht die Intermediärzone (IMZ), aus der später die weiße Substanz hervorgeht. Hier wachsen die Fasern ein, welche die kortikalen Areale untereinander verbinden und den Thalamus mit dem Kortex verknüpfen.

Durch die asymmetrische Teilung radialer Gliazellen werden im Verlauf der Neurogenese neben postmitotischen Neuronen (Abbildung 2 B) auch intermediäre Vorläuferzellen generiert (Abbildung 2 C). Während die apikalen Vorläuferzellen in der VZ lokalisiert sind, verlieren die Intermediärzellen ihre ventrikuläre Verankerung und verlagern ihre Zellkörper in die basaler gelegene Subventrikularzone (SVZ), wodurch sie auch als basale Vorläuferzellen bezeichnet werden (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004; Smart, 1972). Die meisten Intermediärzellen generieren durch terminale symmetrische Zellteilung zwei postmitotische Neurone, jedoch existiert auch ein geringer Anteil basaler Vorläuferzellen, welche durch symmetrische proliferative Teilung die Population an intermediären Vorläuferzellen vergrößern (Götz and Huttner, 2005; Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004). Es wird angenommen, dass die Intermediärzellen im Verlauf der evolutionären Entwicklung des Neokortex durch zusätzliche proliferative Teilungen die Anzahl kortikaler Projektionsneurone und dadurch die Expansion der supragranulären Schichten in Menschen und anthropoiden Affen gesteigert haben (Smart et al., 2002).



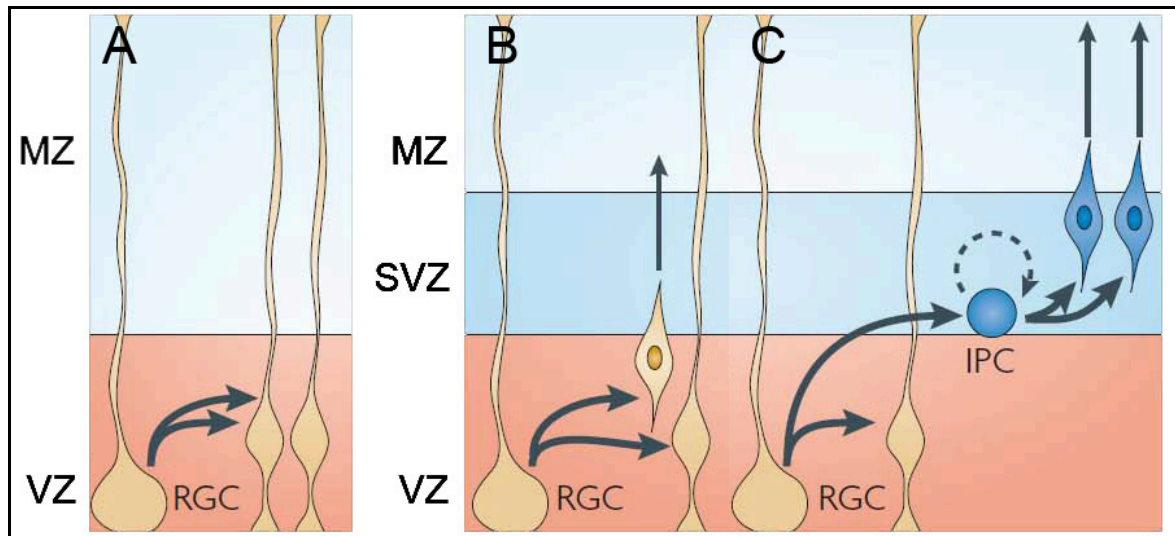


Abbildung 2: Radiale Gliazellen generieren kortikale Vorläuferzellen und postmitotische Neurone. Die glialen Vorläuferzellen sind in der Ventrikulärzone lokalisiert und vergrößern durch symmetrische, proliferative Teilung den Vorrat an kortikalen Vorläuferzellen (A). Durch asymmetrische, Teilungen werden sowohl postmitotische Neurone (B), als auch basale Vorläuferzellen generiert (C). Diese basalen Intermediärzellen residieren in der SVZ und produzieren durch terminale, neurogene Zellteilung exzitatorische Projektionsneurone. IPC= Intermediäre Vorläuferzelle, MZ=Marginalzone, RGC=Radiale Gliazelle, SVZ=Subventrikulärzone, VZ=Ventrikulärzone. Modifiziert nach Dehay and Kennedy (2007).

### 1.1.3 Radiale Migration

Nachdem ein Projektionsneuron den Zellzyklus verlassen hat, beginnt es mit der radialen Wanderung in die kortikalen Zielschichten orthogonal zur Kortexoberfläche. Während der frühen Neurogenese migrieren die exzitatorischen Nervenzellen Glia-unabhängig durch phasische Translokation (Miyata et al., 2001; Nadarajah et al., 2001). Dabei wird zunächst ein Pionierfortsatz in Richtung Kortexoberfläche ausgesendet und fixiert, bevor dann der Zellkörper unter sukzessiver Verkürzung des entsendeten Fortsatzes nachgezogen wird (Book and Morest, 1990; Morris et al., 1998). Während der späteren Kortikogenese dominiert die gliophile Migration, welche auch als Lokomotion bezeichnet wird. Dabei dient der basale Fortsatz radialer Gliazellen als Gerüst, entlang dessen sich postmitotische Projektionsneurone mit dem gesamten Zellkörper entlang zur kortikalen Platte bewegen (Nadarajah, 2003; Rakic, 1972). Auch diese Bewegungsform verläuft phasisch, wobei wieder ein leitender Fortsatz entlang der glialen Struktur ausgesendet und fixiert wird, bevor das Nachziehen des Zellkörpers erfolgt (Cooper et al., 2008).

Es sind bereits verschiedene Faktoren bekannt, die den Prozess der radialen Migration steuern. Beispielsweise regulieren die Präplatte und ihre Derivate die Morphologie radialer Gliafasern und die axonale Wegfindung, wodurch die neuronale Migration beeinflusst wird (Super et al., 1998).

## 1.2 Organisation und Entwicklung des Thalamus

Der Thalamus wird auch als „Tor des Bewusstseins“ bezeichnet, da alle sensorischen Projektionen aus der Peripherie, mit Ausnahme des olfaktorischen Systems, über den Thalamus zum Kortex ziehen (Blackshaw et al., 2010). Als größter Bereich des Dienzephalons geht er aus dem dorsalen Teil des Neuroepithels hervor, welches den dritten Ventrikel umsäumt. Der Thalamus besteht aus einer Vielzahl von Kerngebieten, welche hinsichtlich ihrer Packungsdichte, Lokalisation, Morphologie und zellulären Zusammensetzung unterschieden werden. Weiterhin werden die Kerngebiete aufgrund ihrer Konnektivität mit dem Kortex in spezifische und unspezifische Thalamuskern zusammengefasst. Spezifische Kerne projizieren zu distinkten Arealen auf der Großhirnrinde und erhalten eine starke Rückprojektion aus diesen Bereichen. Dagegen weisen unspezifische Thalamuskern keine, oder lediglich eine schwache direkte Verbindung zum Kortex auf, die nicht auf spezifische Areale beschränkt ist.

Während der thalamischen Entwicklung erfolgt in der Maus ab E11 zunächst die Proliferation und Spezifizierung des Neuroepithels. Durch Neurogenese der kernspezifischen Zellen werden erste postmitotische Neurone geboren, welche in die Mantelzone des sich entwickelnden Thalamus migrieren (Altman and Bayer, 1988) und dadurch ein morphologisch undifferenziertes, pronukleäres Gewebe formen. Erst durch die Bildung von bidirektionalen Projektionen mit dem Kortex werden die Thalamuskern vollständig differenziert, wobei dieser Prozess zum Teil aktivitätsabhängig ist (Molnar and Blakemore, 1995). Die thalamokortikale Projektion erfolgt topographisch, was bedeutet, dass die Nachbarschaftsbeziehungen der thalamischen Kern von den auswachsenden Fasern im Kortex beibehalten werden (Caviness and Frost, 1980; Crandall and Caviness, 1984; Garel and Rubenstein, 2004).

Faszikulierte, thalamokortikale Axone wachsen zwischen E11 und E12 ventral aus dem sich entwickelnden Thalamus heraus und überqueren in einer 90°-Drehung die Grenze zwischen Dienzephalon und Telenzephalon (Molnar, 2000). Nachdem die Axone das ventrale Telenzephalon durchquert haben, erreichen sie die palliale-subpalliale Grenze, wo sie auf kortikofugale Fasern treffen, welche wiederum in den Thalamus projizieren. Verschiedene Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren wurden bereits identifiziert, welche den auswachsenden Axonen den Weg weisen. So sind Oberflächenmoleküle wie Ephrine, Semaphorine oder Cadherine an der Wegfindung der thalamischen Axone beteiligt (Bolz et al., 2004; Lopez-Bendito and Molnar, 2003), aber auch Transkriptionsfaktoren wie Pax6 und Emx2 scheinen eine Rolle zu spielen (Lopez-Bendito et al., 2002; Pratt et al., 2002). Weiterhin wird in der „handshake Hypothese“ vermutet, dass sich die Axone aus dem Thalamus und der kortikalen Platte an der pallialen-subpallialen Grenze vermischen und dann entlang der bereits bestehenden Fasern in das jeweilige Zielgebiet einwandern (Molnar et al., 1998a). Ob die Axone jedoch tatsächlich das Gerüst der bereits

vorhandenen Fasern benötigen, oder ob sie dagegen zellautonom den Weg zum jeweiligen Zielgebiet finden, ist bis jetzt noch nicht ausreichend erforscht.

An E13 erreichen erste thalamokortikale Fasern in der Maus den dorsolateralen Kortex, wo sie tangential in die Intermediärzone einwachsen (Auladell et al., 2000). An E14 haben zahlreiche thalamischen Axone ihre finale arealspezifische Position unterhalb der CP erreicht (Price et al., 2006) und beginnen mit der Invasion der Subplatte, wo die thalamischen Axone in Primaten und Katzen eine Warteperiode einlegen (Ghosh and Shatz, 1992; Rakic, 1977). Bereits an E15 sind erste Fasern in der kortikalen Platte nachweisbar (Auladell et al., 2000), die Mehrheit der Axone wächst jedoch erst an E18 in die CP ein (Molnar et al., 1998b).

### **1.3 Das Eph/Ephrin-System**

#### **1.3.1 Aufbau und Funktion von Ephrinen und Eph-Rezeptoren**

Eph-Rezeptortyrosinkinasen und ihre membrangebundenen Liganden, die Ephrine, werden weitläufig im embryonalen Gehirn exprimiert (Liebl et al., 2003; Niehage, 2008; Peuckert et al., 2008; Yun et al., 2003). Sie regulieren eine Vielzahl entwicklungsrelevanter Prozesse, zu denen Synaptogenese, axonale Lenkung und Wegfindung migrierender Interneurone gehören (Castellani and Bolz, 1997; Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Knoll and Drescher, 2002; Kullander and Klein, 2002; Pasquale, 2005; Rudolph et al., 2010; Zimmer et al., 2011). Sie wirken verzweigungsfördernd auf thalamische Afferenzen (Castellani and Bolz, 1996; Uziel et al., 2008) und sind in die Regulation von Apoptose, Proliferation und Differenzierung involviert (Depaepe et al., 2005; North et al., 2009; Park et al., 2013; Qiu et al., 2008). Weiterhin ist bekannt, dass sie die adhäsiven Eigenschaften kortikaler Zellen beeinflussen (Holmberg and Frisen, 2002; Zimmer et al., 2007) und die topographische Formierung des zerebralen Kortex regulieren (Bolz et al., 2004; Kullander and Klein, 2002; Pasquale, 2005).

Es sind bereits 15 Eph-Rezeptortyrosinkinasen und 9 Ephrin-Liganden identifiziert worden, die aufgrund von Sequenzhomologien und verschiedenen Bindungsaffinitäten in zwei Klassen eingeteilt werden (Gale et al., 1996; Abbildung 3). Während Ephrine der Klasse A mittels Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert sind, weisen Ephrine der Klasse B eine Transmembranregion, sowie eine cytoplasmatische Domäne mit PDZ-Bindemotiv auf (Song et al., 2002; Torres et al., 1998). Eph-Rezeptortyrosinkinasen haben eine extrazelluläre, N-terminale Domäne, welche die spezifische Ligandenbindung ermöglicht (Labrador et al., 1997). Außerdem besitzen sie eine Cystein-reiche Region und zwei Typ II Fibronektin- Domänen, welche die Interaktion mit weiteren Proteinen vermitteln (Dalva et al., 2000).

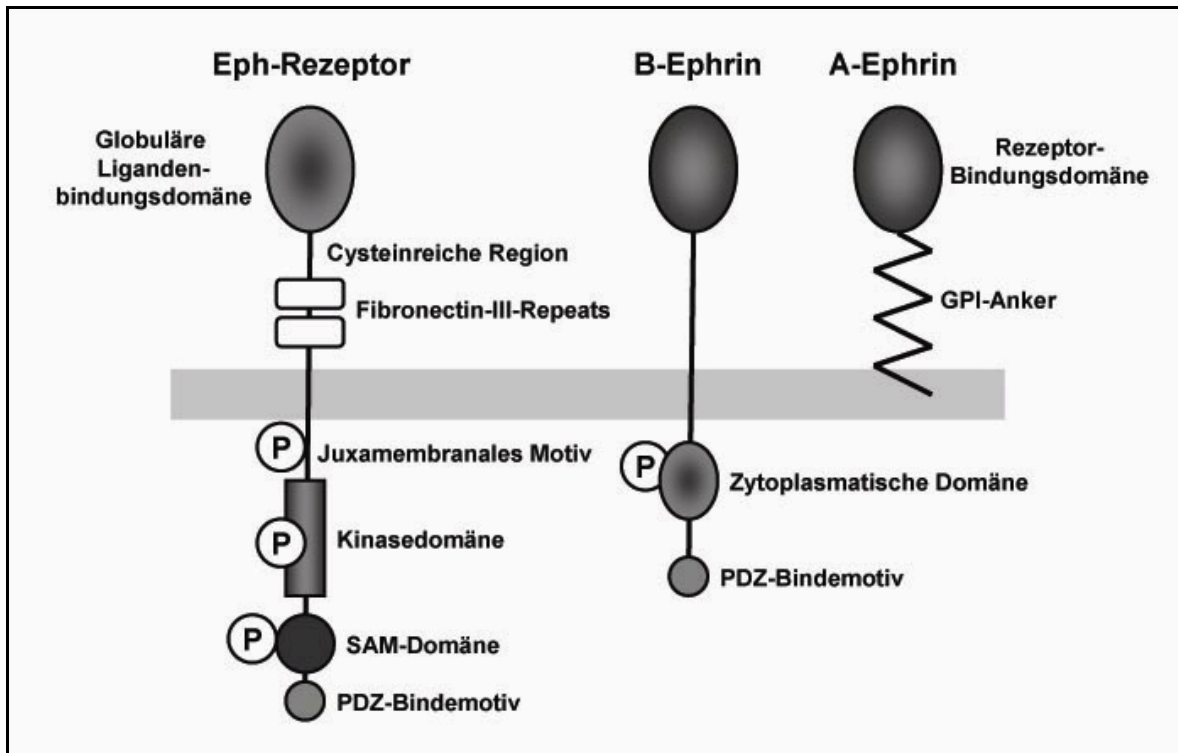


Abbildung 3: Schematischer Aufbau von Eph-Rezeptoren und Ephrinen. Ephrine und ihre Rezeptoren stellen membrangebundene Proteine dar. Ephrin-Liganden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verankerung in der Zellmembran. Während B-Ephrine eine Transmembrandomäne mit cytoplasmatischem Bereich aufweisen, sind A-Ephrine über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert. Modifiziert nach Aoto and Chen (2007).

Eph-Rezeptortyrosinkinasen stellen monomere Rezeptoren dar, die nach Ligandenbindung dimerisieren und sich gegenseitig phosphorelieren. Dazu weisen Eph-Rezeptoren ein stark konserviertes juxtamembranales Motiv sowie eine Kinase-Domäne auf, welche für die Autophosphorylierung benötigt werden. Abschließend besitzen Eph-Rezeptoren eine C-terminale SAM-Domäne, über welche Dimere und Oligomere agglomeriert werden und ein PDZ-Domäne zur Bindung weiterer Proteine, welche die Signaltransduktion modulieren können (Kullander and Klein, 2002; Pasquale, 2008; Torres et al., 1998).



Eine Besonderheit der Eph/Ephrin-Interaktion ist, dass eine bidirektionale Signaltransduktion möglich ist. Durch Rezeptor/Liganden-Interaktionen können ein *forward signaling* in der Rezeptor-tragenden Zelle ausgelöst werden, sowie ein *reverse signaling* in der Liganden-tragenden Zelle (Knoll and Drescher, 2002; Kullander and Klein, 2002; Murai et al., 2003; Wilkinson, 2001). Beim *reverse signaling* führt die Rezeptorbindung bei B-Liganden zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne, wodurch eine Signalkaskade in der Liganden-tragenden Zelle ausgelöst wird. Obwohl A-Ephrine keine intrazelluläre Domäne aufweisen gibt es Hinweise, dass diese mit Hilfe eines transmembranalen Adaptorproteins ein *reverse signaling* initiieren können (Anderson, 1998; Davy et al., 1999).

## 2 Zielstellung

Die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung kortikaler Vorläuferzellen wird von verschiedenen intrinsischen und extrinsischen Faktoren beeinflusst und schon geringe Abweichungen können zerebrale Fehlbildungen und Neurodegeneration zur Folge haben (Chenn, 2008; Kuida et al., 1998; Rakic, 2009). Vorrangegangene Experimente haben bereits gezeigt, dass EphrinA5-defiziente Mäuse eine Verschiebung der kortikalen Schichtung aufweisen, was mit einer veränderten Proliferation der kortikalen Vorläuferzellen assoziiert ist (Gerstmann et al., 2010). Dieser Phänotyp ist aus pathologischer Sicht interessant, weil Veränderungen der kortikalen Organisation und Zytoarchitektur ebenfalls mit mentalen Erkrankungen assoziiert sein können (Jakob and Beckmann, 1994; Parlapani et al., 2009). Da bisher nur wenig über die Bedeutung von Ephrinen auf die kortikale Schichtenbildung bekannt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Signalmoleküls EphrinA5 auf die Ausbildung der laminaren Organisation anhand einer *loss of function* Mausmutante untersucht werden.

### 2.1 Vergleichende Charakterisierung der Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen in EphrinA5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren

Vorrangegangene Experimente haben bereits Hinweise geliefert, dass die Schichtenverschiebung in EphrinA5-defizienten Mäusen durch eine veränderte Proliferation der kortikalen Vorläuferzellen verursacht wird. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, mögliche proliferative Unterschiede in EphrinA5-knockout Mäusen zu identifizieren und genauer zu charakterisieren. Dazu sollte mit Hilfe spezifischer immunhistochemischer Markierungen die Anzahl und Verteilung apikaler und basaler Vorläuferzellen analysiert werden. Weiterhin sollte die Anzahl an kortikalen Vorläuferzellen ermittelt werden, die während der Bildung der infra- und supragranulären Schichten den Zellzyklus verlassen und ausdifferenzieren. Zudem sollte der Einfluss von EphrinA5 auf den Teilungsmodus kortikaler Vorläuferzellen und die Identität der resultierenden Tochterzellen untersucht werden.

### 2.2 Identifizierung des Effekt-vermittelnden Rezeptors

Eine Fragestellung, die es zu beantworten galt, war, welche Eph-Rezeptortyrosinkinase durch EphrinA5-Bindung den Effekt vermittelt. Mittels *in situ* Hybridisierungen sollten zunächst potentielle EphrinA5-Interaktionspartner identifiziert werden, die von kortikalen Vorläuferzellen exprimiert werden. Durch immunhistochemische Markierungen, RT-PCR und Bindungsstudien sollte dann die Expression verifiziert und die mögliche EphrinA5-induzierte Aktivierung des Rezeptors analysiert werden.

### **2.3 Charakterisierung des Mechanismus der Rezeptor/Liganden-Bindung**

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu charakterisieren, wie eine lokale Interaktion von EphrinA5 und EphA4 im sich entwickelnden Neokortex möglich wird, da die membrangebundenen Interaktionspartner in unterschiedlichen Bereichen des embryonalen Gehirns gebildet werden. Dazu wurde zunächst mittels *in situ* Hybridisierung und RT-PCR an kortikalen Einzelzellen die Expression von Rezeptor und Ligand untersucht. Durch Bindungsstudien, *in situ* Hybridisierung, immunhistochemische Markierungen und *Tracing* Experimente sollte außerdem ermittelt werden, ob EphrinA5 von thalamischen Fasern exprimiert wird und ob die thalamokortikale Projektion den Liganden während der Neurogenese in den sich entwickelnden Neokortex importiert.



### 3 Material und Methoden

Alle verwendeten Geräte, Materialien und chemische Substanzen sind im Anhang 9.2.1 aufgelistet. Die Zusammensetzung der Puffer, Medien und Stammlösungen ist ebenfalls im Anhang unter 9.2.4 aufgeführt.

#### 3.1 Verwendete Organismen

##### 3.1.1 Versuchstiere, Haltung und Verpaarung

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse (*Mus musculus*) des wildtypischen Stammes C57BL/6J (Wildtyp, WT) und EphrinA5-defiziente Versuchstiere (efnA5 ko, KO) verwendet (Knoll et al., 2001). Die transgenen Tiere weisen im Exon 2 des EphrinA5-Gens eine Deletion von 280 bp auf, welche eine Verschiebung des Leserahmens und dadurch ein inaktives Genprodukt verursacht. Weiterhin wurden EphA4-PLAP Mäuse (EphA4 ko) verwendet (Leighton et al., 2001). Die Haltung und Zucht erfolgte unter Standardbedingungen bei 21 °C und einem konstanten 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus, mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser. Zur Altersbestimmung der Embryonen wurden die Mäuse über Nacht (ü.N.) verpaart, wobei der Folgetag als Embryonaltag 1 (E1) definiert wurde. Durch regelmäßiges Ermitteln des Gewichts konnte festgestellt werden, ob eine Schwangerschaft vorliegt. Der Tag der Geburt wurde als Postnataltag 1 (P1) festgelegt. Haltung und experimentelle Handhabung erfolgten unter tierschutzrechtlichen Bedingungen im Einverständnis der Friedrich-Schiller Universität und des Universitätsklinikums Jena.

##### 3.1.2 Wirtsbakterien

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente Wirtsbakterien (*Escherichia coli*) des Stammes DH5 $\alpha$  (Invitrogen) verwendet. Dieser Stamm gewährleistet durch eine Rekombinationsdefizienz (recA1<sup>-</sup>) die Stabilität des Inserts und eine Deletion der DNA-spezifischen Endonuklease I (endA1<sup>-</sup>) sorgt für eine größere Ausbeute und Qualität der präparierten Plasmide. Die Bakterien wurden als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert.

#### 3.2 Zellbiologische Methoden

Die Isolation und Präparation des murinen Gehirngewebes erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Laminarbox. Alle verwendeten Geräte, Pufferlösungen, Medien und sonstigen Hilfsmittel wurden desinfiziert beziehungsweise keimfrei hergestellt. Die Arbeitsflächen, das verwendete Präparationsbesteck und Pipetten wurden vor dem Gebrauch sorgfältig mit 70 % Ethanol (EtOH) gereinigt, Puffer und Materialien aus Kunststoff 20 min bei 121 °C autoklaviert

sowie Glasgeräte 6 h bei 180 °C gebacken. Zusätzlich wurden sterile Einweg-Materialien verwendet. Die Kultivierung der Primärkulturen erfolgte unter humiden Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Am Folgetag wurde stets das alte Medium durch frisches, vorgewärmtes Kulturmedium (37 °C) ersetzt.

### **3.2.1 Beschichten der Deckgläschen mit homogenem Substrat**

Um eine flexible Handhabung zu gewährleisten, erfolgte die Kultivierung kortikaler Einzelzellen und thalamischer Explantate auf rechteckigen Deckgläschen (18 x 18 mm). Um Adhäsion und Auswachsen der kultivierten Zellen und Axone zu gewährleisten, wurden die Deckgläschen beschichtet. Dazu mussten sie zunächst entfettet und gereinigt werden, indem sie 10 min in 70 % EtOH gekocht wurden. Nach Abdampfen des Alkohols unter der Sterilbank, erfolgte eine Sterilisation für 6 h bei 180 °C. Die so vorbereiteten Deckgläser wurden stets vor Beginn des Versuchs frisch beschichtet. Dazu erfolgte eine Inkubation mit 19,5 µg/ml Laminin (Gibco) und 5 µg/ml Poly-L-Lysin (Gibco) in GBSS für 30 min bei 37 °C im Brutschrank, wobei 100 µl dieser Lösung zwischen zwei Deckgläschen geschichtet wurden. Vor Gebrauch wurden die Deckgläschen in bidestilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet.

### **3.2.2 Organentnahme und Präparation von Gehirngewebe**

Zur Entnahme der Embryonen wurde das Muttertier mit einer Überdosis (1 ml) 10 %igen Chloralhydrats intraperitoneal betäubt und nach Ausbleiben des Schmerzreflexes wurde der Uterus entnommen. Anschließend erfolgte die Tötung des adulten Tieres durch Dekapitation. Die Gehirne der entnommenen Embryonen wurden in eiskaltem GBSS/0,65 % Glucose herauspräpariert. Je nach Versuchsablauf wurde das gesamte embryonale Gehirn verwendet, oder die gewünschte Region mit Hilfe einer zurechtgeschnittenen Rasierklinge (ca. 0,5 cm; Wilkinson) in einem Klingenhalter (INSTO) herausgeschnitten und für die anschließende Verwendung in eiskaltem GBSS/0,65 % Glucose gesammelt.

### **3.2.3 Herstellung und Kultivierung kortikaler Einzelzellen**

Für die Herstellung dissoziierter Einzelzellen (Zimmer et al., 2007) wurden die embryonalen Gehirne an E14,5 und E16,5 isoliert, der somatosensorische Kortex präpariert und in 1 ml eiskaltem GBSS/0,65 % Glucose gesammelt. Anschließend wurde das embryonale Gewebe durch die Zugabe von 0,05 % Trypsin 17 min bei 37 °C enzymatisch vereinzelt. Um die Trypsinierung zu inhibieren, wurde das Enzymgemisch vorsichtig abgenommen und 1 ml Einzelzellmedium mit 10 % FBS hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine mechanische Vereinzelung durch mehrmaliges Aufziehen der Zellsuspension mit einer abgerundeten Pasteurpipette. Verbliebene

Zellaggregate wurden mittels Filtration durch ein Nylonnetz (Maschengröße 180 µm x 180 µm; Millipore) entfernt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW Zellzahl/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor}^{-1} \times 10^4$$

Für immunhistochemische Markierungen und Bindungsstudien wurden die Zellen in einer Dichte von 300 Zellen/mm<sup>2</sup> auf die beschichteten Deckgläschen aufgebracht. Nach ca. 30 min waren die Zellen adhärent und wurden für 1 Tag (1div) in Einzelzellmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend erfolgte entweder die Stimulation mit rekombinantem EphrinA5-Fc oder Kontroll-Fc für 3 h (siehe 3.2.7) oder die Fixation in 4 % PFA/PBS.

### **3.2.4 Pair-cell Assay**

Für den funktionellen Teilungsversuch erfolgte die Herstellung dissoziierte Einzelzellen aus dem somatosensorischen Kortex wie unter 3.2.3 beschrieben. Jedoch wurden die kortikalen Einzelzellen in einer Dichte von 50 Zellen/mm<sup>2</sup> auf die beschichteten Deckgläschen aufgebracht und für genau 24 Stunden (24 hiv) in Differenzierungsmedium kultiviert. Das Medium war dabei entweder mit 5 µg/ml rekombinantem EphrinA5-Fc oder mit Kontroll-Fc versetzt, welche zuvor 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit einem Alexa488-konjugierten Antikörper agglomerierten (siehe 3.2.7). Nach der Kultivierung für 24 hiv bei 37 °C und 5 % humider CO<sub>2</sub>-Atmosphäre folgte die Fixierung in 4 % PFA/PBS und anschließend eine immunhistochemische Markierung gegen Nestin und βIII-Tubulin.

### **3.2.5 Anfertigung organotypischer Schnittkulturen**

Für die Herstellung lebender Schnittkulturen (Zimmer et al., 2011) wurden die isolierten embryonalen Gehirne (E14,5) zunächst in 4 % *low-melt* Agarose (Sigma) eingebettet und dann bis zum Aushärten der Agarose bei 4 °C aufbewahrt. Im Anschluss erfolgte die Anfertigung von 300 µm Koronalschnitten am Vibratom VT100S (Leica) in eiskaltem, unsterilem Krebspuffer. Die Schnitte wurden in eiskaltem *postholding buffer* gesammelt, anschließend auf Polycarbonat-Membranen (Porengröße 0,1 µm; Sabeu GmbH) aufgezogen und dann in serumfreiem Neurobasalmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Es folgte entweder die Stimulation mit rekombinantem EphrinA5-Fc im Medium (siehe 3.2.7) oder es wurden EphrinA5-Fc-beschichtete Agarosekugeln in der kortikalen Platte platziert.

Die Agarosekugeln (Santa Cruz Biotechnology) wurden mehrmals in PBS gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C mit 5 µg/ml rekombinantem EphrinA5-Fc (R&D-Systems) inkubiert. Bevor die Agarosekugeln in die CP der Schnittkulturen EphrinA5-defizienter Mäuse platziert wurden,

mussten sie wieder mehrmals in eiskaltem PBS gewaschen werden. Nach 2 div folgte die Fixation in 4 % PFA/PBS und eine immunhistochemische Markierung gegen Tbr2 (siehe 3.3.4.2).

### **3.2.6 Kultivierung thalamischer Explantate**

Für die Herstellung thalamischer Explantate (Ruediger et al., 2013) wurden zunächst Vibratom-schnitte von embryonalen Gehirnen an E14,5 angefertigt, wie unter 3.2.5 beschrieben ist. Mit Hilfe einer zurechtgeschnittenen Rasierklinge (ca. 0,5 cm; Wilkinson) in einem Klingenhalter (INSTO) wurde der Thalamus aus den Schnittkulturen herauspräpariert und in sterilem Krebspuffer bei 4 °C gesammelt. Die Thalami wurden manuell in kleine Explantate gehackt und dann mittels einer Pipette in MZ-Medium überführt und vereinzelt. Während einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> rundeten sich die Explantate ab und wurden im Anschluss auf beschichteten Deckgläschen kultiviert. Dazu wurde ein einzelnes beschichtetes Deckglas (siehe 3.2.1) in einer Petrischale (Ø 35 mm) platziert, mit 200 µl Medium bedeckt und für mindestens 10 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch Schwenken homogen verteilt und dann mit Hilfe einer Pipette 25-30 Explantate pro Deckglas aufgebracht und verteilt. Dabei war es entscheidend, nicht die Beschichtung zu zerkratzen und zu vermeiden, dass die Explantate austrocknen. Die thalamischen Explantate adhärten 20 min im Brutschrank, bevor die Petrischale mit 1 ml MZ-Medium aufgefüllt wurde und die Inkubation über 1 div bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte.

### **3.2.7 Stimulation mit rekombinanten Proteinen**

An dissoziierten Einzelzellen sowie organotypischen Schnittkulturen an E14,5 + 1 div wurden Bindungsstudien mit rekombinantem EphA3-Fc oder EphrinA5-Fc durchgeführt. Außerdem wurden thalamische Axone an E14,5 + 1 div mit rekombinantem EphA3-Fc stimuliert. Dazu wurde jeweils 5 µg/ml rekombinantes EphrinA5-Fc, EphA3-Fc (R&D Systems) oder Kontroll-Fc (Alexis Biochemicals) mit 20 µg/ml Alexa488 konjugiertem oder unmarkierten anti human-Fc Antikörper (Invitrogen) für 30 min bei RT geclustert und anschließend in das Kulturmedium gegeben. Nach einer Inkubation für 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Explantate in 37 °C warmen PBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA/PBS fixiert.

### **3.2.8 Nukleinsäurefärbung mit Syto14®**

Zur Visualisierung der Nukleinsäuren in thalamischen Explantaten wurde eine Färbung mit dem Farbstoff Syto14® (Invitrogen) durchgeführt. Dieser fluoreszente Marker interkaliert in Nukleinsäuren lebender Zellen. Dabei ist die Signalintensität um ein sechsfaches stärker, wenn der Farbstoff mit RNA interagiert (Knowles et al., 1996). Um die Nukleinsäuren in den thalamischen

Explantaten anzufärben, wurden diese 3 h vor der Fixation mit 5 µg/ml Syto14® im Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend mit 37 °C warmen PBS gewaschen und mit 4 % PFA/PBS fixiert.

### **3.3 Immunhistochemische Methoden**

#### **3.3.1 Injektion von BrdU**

Zur vergleichenden Untersuchung der Proliferation in WT und EphrinA5-ko Mäusen wurde zeitlich verpaarten Mäusen 50 mg/kg des Teilungsmarkers BrdU (Sigma) intraperitoneal injiziert. Das verwendete BrdU lag in einer Stammlösung von 10 mg/ml in 0,007 N NaOH vor und die Lagerung des Thymidinanalogons erfolgte bei –20 °C.

#### **3.3.2 Perfusion postnataler Versuchstiere**

Für die immunhistochemische Analyse der kortikalen Schichten wurden die adulten Versuchstiere an P37 transkardial perfundiert. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit 200 µl 10 % Chloralhydrat anästhesiert. Nach Ausbleiben des Schmerzreflexes wurde das Herz vom Brustkorb her frei präpariert, indem Bauchfell und Brustkorb vorsichtig aufgeschnitten und entfernt wurden. In die linke Herzkammer wurde eine Kanüle (Ø 0,7 mm; Stericon) eingeführt, durch die zunächst 10 min mit PBS und danach 20 min mit 4 % PFA/PBS perfundiert wurde, wobei die rechte Herzkammer angeschnitten wurde, damit die Flüssigkeit ablaufen konnte. Ein Indikator für eine gelungene Perfusion war, wenn die Mäuse durch die Fixation fest wurden. Versuchstiere, die diese Veränderung nicht aufwiesen, wurden nicht zur immunhistochemischen Untersuchung weiterverwendet. Nach der Perfusion erfolgten die Dekapitation und Präparation des adulten Gehirns. Dabei wurde zunächst die Kopfhaut entfernt und dann durch einen rostralen Schnitt vom Hinterhauptsloch der Schädel an der Mittellinie geöffnet. Die Schädelplatte wurde anschließend mit zwei Pinzetten vorsichtig entfernt und das adulte Gehirn mit einem Spatel herausgenommen. Vor dem Einfrieren wurde das isolierte Gehirn nochmals 3-4 h in 4 % PFA nachfixiert, bevor es anschließend in PBS gewaschen und jeweils ü.N. in 15 % Sucrose und dann in 30 % Sucrose inkubiert wurde. Danach erfolgten ein schnelles Einfrieren mit flüssigem N<sub>2</sub> und die Lagerung bei –80 °C.

#### **3.3.3 Herstellung von Gefrierschnitten**

Für die immunhistochemischen Markierungen wurden Gefrierschnitte von eingefrorenem Gewebe mit einem Kryotom CM1900 (Leica) hergestellt. Dabei erfolgte das Aufblocken der fixierten Gehirne bei –20 °C mit Tissue Tek® (Sakura). Anschließend wurden 20 µm dicke alternierende Koronalschnitte von anterior nach posterior bei –20 °C angefertigt, die auf

Superfrost-Objektträger (Thermo Scientific) aufgezogen wurden. Die Schnitte trockneten 2 h bei RT, bevor sie bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum weiteren Gebrauch lagerten. Die Schnitte für die *in situ* Hybridisierung (ISH) wurden zum Schutz vor RNA-Degradation auf einer Heizplatte bei  $55^{\circ}\text{C}$  getrocknet und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.3.4 Immunhistochemische Markierung**

Für die immunhistochemische Markierung wurde stets fixiertes Gewebe verwendet. Als Waschlösung diente PBS/0,2 % TritonX und alle Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt. Die verwendeten primären Antikörper sind der Tabelle 6 (Anhang 9.2.2) zu entnehmen. Die genutzten sekundären Antikörper sind in Tabelle 7 (Anhang 9.2.2) aufgelistet. Die Antikörper wurden stets in Blockierlösung (10 % ZNS, 4 % BSA in 1X PBS/0,2 % TritonX) auf ihre Endkonzentration verdünnt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und DAPI erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen, um Ausbleichen des Fluorophors zu vermeiden. Bei immunhistochemischen Doppelmarkierungen wurden die jeweils verwendeten primären beziehungsweise sekundären Antikörper als Mix verwendet. Die Lagerung der Präparate erfolgte angedunkelt bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.3.4.1 Immunhistochemische Markierung in Gefrierschnitten**

Die  $20\text{ }\mu\text{m}$  dicken Gefrierschnitte wurden 15 min bei RT aufgetaut und im Folgenden dreimal 10 min bei RT in PBS/0,2 % TritonX (Waschpuffer) gespült. Um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper zu verhindern, erfolgte anschließend eine zweistündige Blockierung bei RT in Blockierlösung und anschließend die Inkubation ü.N. bei RT mit dem primären Antikörper in einer feuchten Kammer. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte wieder dreimal mit dem Waschpuffer gespült und dann 2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper in einer abgedunkelten, feuchten Kammer inkubiert. Es erfolgten drei weitere Waschschrte (10 min) und eine Inkubation mit DAPI (100 ng/ml in PBS; Molecular Probes) für 15 min bei RT. Die Schnitte wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gespült und in Mowiol (Roth) eingebettet.

Um BrdU zu markieren, mussten die Schnitte vor der Blockierung 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in 2 N HCl inkubiert, und anschließend dreimal 10 min in Waschpuffer gespült werden. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper wie bereits beschrieben.

#### **3.3.4.2 Immunhistochemische Markierung an organotypischen Schnittkulturen**

Die kultivierten Vibratonschnitte wurden zunächst 1,5 h bei RT in 4% PFA/PBS fixiert und anschließend dreimal 30 min in PBS gespült. Alle weiteren Schritte der immunhistochemischen Markierung erfolgten in einer Petrischale ( $\varnothing$  35 mm) auf einem Orbitalschüttler KS260 basic (IKA)

bei 50 rpm. Nach dreimaligem Waschen (30 min) erfolgte die Blockierung für 2 h und die Inkubation mit dem primären Antikörper ü.N. bei RT. Anschließend wurden die Vibratomschnitte wieder dreimal 30 min gewaschen und anschließend 4 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten (30 min) wurden die Schnitte auf Objektträgern in Mowiol eingebettet.

#### **3.3.4.3 Immunzytochemische Markierung an kortikalen Einzelzellen**

Die kultivierten Einzelzellen wurden nach einer zehnminütigen Fixation mit 4 % PFA/PBS dreimal 10 min in PBS, und dann dreimal 10 min in Waschpuffer gespült. Alle Waschschriffe, sowie die Fixation erfolgten in einer Petrischale (Ø 35 mm). Es folgte die Blockierung für 1 h bei RT und die Inkubation mit dem primären Antikörper ü.N. in einer feuchten Kammer. Dann wurden die Zellen dreimal 10 min gewaschen und anschließend 2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschriffe (10 min) erfolgte die Inkubation in DAPI (100 ng/ml in PBS) für 5 min bei RT. Zum Einbetten wurden die Deckgläschen mit den kortikalen Einzelzellen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült und in Mowiol auf Objektträgern eingebettet.

#### **3.3.5 Dil Tracing-Experimente**

Um die thalamokortikale Projektion im embryonalen Telenzephalon darzustellen, wurden *Tracing*-Experimente mit dem lipophilen Farbstoff Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate; Molecular probes) durchgeführt. Das fluoreszierende Dil kann im fixierten Gewebe sowohl als retrograder, als auch als anterograder Marker eingesetzt werden (Godement et al., 1987). Mit Hilfe einer Nadel wurde ein kleiner Kristall Dil aufgenommen und in den somatosensorischen Kortex embryonaler WT-Gehirne appliziert, welche zuvor ü.N. in 4 % PFA/PBS fixierten. Es folgte eine Inkubation über vier Wochen bei 37 °C in 30 % Sucrose. Während der Inkubation dringt der Farbstoff in die angrenzenden Zellen ein, verteilt sich durch Diffusion über die Lipidmembran und visualisiert dadurch die gesamte Morphologie einer Zelle. Nach Ablauf der vier Wochen wurden die Gehirne in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und koronale Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden 15 min bei RT mit DAPI (100 ng/ml in PBS) inkubiert, bevor die Schnitte in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült und anschließend in Mowiol eingebettet wurden.

### **3.4 Molekularbiologische Methoden**

Die Arbeit mit RNA erforderte besondere Maßnahmen, um Degradation durch ubiquitär vorkommende RNA-Ribonukleasen (RNasen) zu vermeiden. So standen gesonderte Arbeitsplätze, Chemikalien, Geräte und sonstige Hilfsmittel für den Umgang mit RNA zur Verfügung. Eine weitere Maßnahme stellte das regelmäßige Wechseln von Handschuhen und Kitteln dar. Um

RNase-Kontamination zu vermeiden wurden alle Arbeitsflächen, Geräte und Hilfsmittel sorgfältig mit einer Reinigungslösung (100 mM NaOH, 0,5 % SDS) abgewischt. Glas und Metallgeräte konnten durch die Behandlung bei 180 °C für 6 h dekontaminiert werden. Flüssigkeiten wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC; Thermo Scientific) versetzt, mindestens 1 h unter einem Abzug gerührt und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Dabei hydrolysierte das DEPEC zu EtOH und CO<sub>2</sub>. Da DEPC eine kovalente Bindung mit primären und sekundären Aminen eingeht, wird die Aktivität der RNAsen inhibiert. Deshalb können Lösungen, die Nukleophile enthalten, nicht mit DEPC behandelt werden und wurden daher mit DEPC-behandeltem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub>) angesetzt. Um potentielle RNA-Degradation noch zusätzlich zu verringern, wurden alle Arbeitsschritte mit RNA, soweit nicht anders beschrieben, auf Eis durchgeführt.

### **3.4.1 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren**

#### **3.4.1.1 Präparation von Gesamt-RNA aus murinem Gewebe**

Um die Expression entwicklungsrelevanter Gene an verschiedenen Entwicklungszeitpunkten zu analysieren, wurde die gesamte RNA aus dem somatosensorischen Kortex embryonaler Tiere isoliert. Dazu erfolgte zunächst die Präparation der gewünschten Kortexregion, wie unter 3.2.2 beschrieben. Die entnommenen Gewebestücke wurden sofort in 500 µl Trizol® Reagent (Invitrogen) transferiert und mithilfe eines Homogenisators zerrieben. Trizol ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidinium-Isothiocyanat, welches Proteine denaturiert und diese in einen hydrophoben Zustand versetzt, wodurch Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Kanüle (Ø 0,6 mm; Stericon) wurde die genomische DNA gescheert. Dann folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl eiskaltem Chloroform und einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und 4 °C konnte eine Phasentrennung beobachtet werden. Die RNA ist in der oberen wässrigen Phase zu finden, während sich Proteine und DNA in der unteren organischen Phase und Interphase befinden. Die obere RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropylalkohol versetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min bei RT erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen und anschließend für 5 min bei 7500 g zentrifugiert. Das erhaltene RNA Pellet trocknete bei RT, bevor es in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> für 10 min bei 55 °C gelöst wurde. Die Reinheit und Konzentration der aufgereinigten RNA wurde photometrisch ermittelt, während die Qualität und Integrität durch Gelelektrophorese analysiert werden konnte. Um zu analysieren, ob die Proben mit genomischer DNA kontaminiert sind, wurde eine PCR mit sequenzspezifischen Primern gegen das konstitutiv exprimierte Gen βAktin durchgeführt (siehe



3.4.5.2). Da RNA nicht durch Taq-Polymerasen amplifiziert wird, entstehen Banden nur durch die Kontamination mit genomischer DNA. Es wurden nur solche Proben weiterverwendet, die nach der PCR gegen  $\beta$ Aktin keine Bande im Agarosegel aufwiesen. Die Lagerung aller RNA-Proben erfolgte bei -80 °C.

#### **3.4.1.2 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse**

Die verwendeten Sonden lagen als cDNA in Vektoren vor (siehe Tabelle 9, Anhang 9.2.3), die wiederum mittels Wirtsbakterien gelagert und vervielfältigt wurden. Daher war es für die weitere Verwendung notwendig, die Plasmide zu isolieren und aufzureinigen. Dazu wurden die entsprechenden Bakterien in 3 ml LB-Medium (mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin) über Nacht kultiviert und am Folgetag geerntet. Dabei erfolgte zunächst eine Zentrifugation der Bakteriensuspension für 1 min bei 12000 g, wobei der Überstand verworfen wurde. Nach dem Resuspendieren des Bakterien-Pellets in 50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien durch 0,2 N NaOH und 1 % (w/v) SDS. Bei der alkalischen Lyse werden die Bakterien aufgeschlossen und die meisten Proteine sowie die DNA denaturieren (Birnboim and Doly, 1979). Während die kurze Plasmid-DNA nach der Neutralisation wieder renaturiert, fallen genomische DNA und Proteine aus. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurden die Lysate schleimig und mussten mit 3 M Kaliumacetat (pH 5.2) neutralisiert werden. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12000 g. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200  $\mu$ l Chloroform versetzt und nach mehrmaligem Invertieren erneut für 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Es folgte eine quantitative Fällung durch Alkohol. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,3 M Natriumacetat versetzt und schließlich mit 1 ml eiskaltem Isopropanol gefällt. Die Präzipitation erfolgte bei 12000 g und 4 °C für 15 min. Das erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem, 70%igem EtOH bei 12000 g und 4 °C für 5 min gewaschen. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 50  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen und die aufgereinigte DNA photometrisch sowie mittels Gelelektrophorese hinsichtlich der Konzentration und Qualität untersucht (siehe 3.4.2). Die Lagerung von DNA erfolgte bei -20 °C.

#### **3.4.2 Qualitative und Quantitative Analyse von Nukleinsäuren**

##### **3.4.2.1 Spektroskopische Analyse der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren**

Die Reinheit und Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch, mit Hilfe eines NanoDrop<sup>TM</sup>1000 (Peqlab Biotechnologie) analysiert. Dabei wurde die optische Dichte (OD) im Vergleich zur Referenzlösung bei 230 nm, 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Quotient aus OD260/OD280 ist ein Maß für die Verunreinigung mit Proteinen, während das Verhältnis aus

OD260/OD230 eine mögliche Kontamination mit Phenol anzeigt. Die berechneten Werte sollten zwischen 1,8 und 2 liegen.

### **3.4.2.2 Gelelektrophorese**

Die Qualität und Integrität von RNA wurde elektrophoretisch analysiert. Durch diese Methode ist auch der Nachweis von DNA-Fragmenten möglich. Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde je nach zu erwartender Fragmentgröße 1-2 % Agarose in TAE aufgekocht, mit 0,02 % Ethidiumbromid versetzt und in eine horizontale Gelkammer (Peqlab Biotechnologie) gegossen. Die Proben wurden mit 0,1 % Ladepuffer versetzt und in der Gelkammer bei einer Feldstärke von 3-5 V/cm in TAE elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz dienten 0,2 µg einer 100 bp DNA-Leiter (Ares Bioscience). Um die Qualität und Integrität von RNA zu analysieren, wurden jeweils 500 ng der RNA mit 10 µl Formamid versetzt, 5 min bei 99 °C denaturiert und anschließend mit Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Transiluminator VisiDoc-It™ Imaging Systems (UVP).

### **3.4.3 Modifikation von Nukleinsäuren**

#### **3.4.3.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Restriktionsenzyme erkennen vier bis acht Basenpaare palindromischer DNA-Sequenzen und schneiden beide Enden an einer definierten Stelle auf. Dabei entstehen entweder kohäsive oder glatte Enden. Um RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung herzustellen war es notwendig, die entsprechenden Vektoren mit Hilfe solcher Nukleasen zu verdauen. Welche Restriktionsenzyme für die Herstellung der RNA-Sonden verwendet wurden, sind in Tabelle 10 (Anhang 9.2.3) zusammengefasst. Es wurden jeweils 3 µg Plasmid-DNA mit 1 U fastDigest® Restriktionsenzym (Fermentas) in 1X Reaktionspuffer linearisiert. Der Verdau erfolgte für 2 h bei 37 °C, mit einer anschließenden Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C. Die Qualität der Restriktion wurde elektrophoretisch analysiert.

#### **3.4.3.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren**

Durch Dephosphorylierung soll die Religation von freien Enden nach einer Restriktion verhindert werden. Dazu wurde 1 U SAP (shrimp alkaline phosphatase; Fermentas) direkt in den Restriktionsansatz gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C.

### 3.4.3.3 Erzeugung glatter Enden

Die durch Restriktion entstandenen kohäsiven Enden können als Anhaftungsstelle für RNA-Polymerasen dienen und müssen daher vor der *in vitro* Transkription mit Hilfe von T4 DNA-Polymerase (Fermentas) geglättet werden. Durch die 5'→3' Polymeraseaktivität werden die überhängenden 5'-Enden mit dNTPs aufgefüllt, während die überhängenden 3'-Enden durch die Endonukleaseaktivität des Enzyms hydrolytisch abgespalten werden. Zu der verdauten Plasmid-DNA wurden 3 U der T4 DNA-Polymerase, sowie je 100 µM dNTP hinzugefügt und der Ansatz 20 min bei 12 °C inkubiert. Es folgte eine zehnminütige Hitzeinaktivierung bei 70 °C.

### 3.4.5 Synthese von Nukleinsäuren

#### 3.4.5.1 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA

Da RNA nicht durch PCR amplifiziert werden kann und sie schnell degradiert, wurde die isolierte mRNA mittels reverser Transkription in stabile cDNA umgeschrieben. Dabei wurde 1 µg der isolierten RNA für 5 min bei 70 °C mit 5 µM Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer denaturiert und nachfolgend auf Eis abgeschreckt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu reduzieren. Danach folgte eine Inkubation für 60 min bei 42 °C mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, je 0,1 mM dNTP, 20 U RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas) und 10 U RevertAid™ H Minus M-MuLV reverse Transkriptase (Fermentas). Daran schloss sich eine Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 15 min an. Das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung für die PCR verwendet werden und wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.5.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch PCR werden mittels spezifischer Primer Zielsequenzen in doppelsträngigen Nukleinsäuren amplifiziert. Dabei können einerseits relevante Transkripte in den hergestellten cDNA-Bibliotheken detektiert werden und andererseits aufgereinigte RNA auf eine mögliche Kontamination durch genomische DNA untersucht werden. Ein PCR-Ansatz bestand aus 20 mM Tris-HCl (pH 8.55), 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween20, 1X Enhancer, je 50 µM dNTP, je 20 pmol Primer (*forward* und *reverse*) und 1,5 U HotStart Taq-DNA-Polymerase (PEQLAB Biotechnologie). Die Amplifizierung erfolgte über 35 Zyklen in einem spezifischen Programm. Der erste Schritt des PCR-Programms stellte die Aktivierung der Taq-Polymerase für 5 min bei 95 °C dar. Es folgte die Denaturierung für 30 sec bei 95 °C, im Anschluss daran die Hybridisierung der Primer für 30 sec (die primerspezifischen *Annealing*-Temperaturen sind der Tabelle 8 im Anhang 9.2.3 zu entnehmen) und schließlich eine Elongation bei 72 °C für 1 min. Nach 35 Zyklen wurden die Proben 7 min bei 72 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf 4 °C abgekühlt.

### 3.4.5.3 Herstellung einer mRNA-Sonde durch *in vitro* Transkription

Für die *in situ* Hybridisierung (ISH) wurden Digoxigenin-markierte mRNA-Sonden verwendet, die durch *in vitro* Transkription von einer *template* DNA hergestellt wurden. Die hergestellten Sonden binden komplementär an ihre Ziel-mRNA und das eingebaute Digoxigenin kann darauffolgend durch spezifische Antikörper und eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Für die *in vitro* Transkription wurden spezifische Bakteriophagen-RNA-Polymerasen (T3 oder T7 RNA-Polymerase; Fermentas) verwendet, die jeweils eine ausgeprägte Spezifität für ihre Promotorsequenz besitzen und die RNA-Synthese von einer *template* DNA katalysieren. Die *in vitro* Transkription erfolgte in einem Ansatz aus 1 µg linearisierter, geglätteter Plasmid-DNA, 1X Reaktionspuffer (40 mM TrisHCl (pH 7.9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 2 mM Spermidin), 0,5 mM Desoxigenin-markierte dNTPs (Roche), 20 U RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas) und 40 U RNA-Polymerase. Der gesamte Ansatz inkubierte 2h bei 37 °C und wurde anschließend durch die Zugabe von 0,05 M EDTA (pH 8) inaktiviert. Es folgte eine Ethanolfällung, bei der zunächst die Salzkonzentration mit 1 M LiCl erhöht wurde, um anschließend die RNA mit einem dreifachen Überschuss an absoluten EtOH für mindestens 30 min bei -80 °C zu präzipitieren. Es folgten eine Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4 °C und ein weiterer Waschschriff mit eiskaltem 70 %igem EtOH für 10 min bei 12.000 g und 4 °C. Anschließend wurde die RNA in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> gelöst und die Konzentration photometrisch gemessen. Außerdem wurde die Qualität der hergestellten Sonde durch Gelelektrophorese untersucht. Die Lagerung erfolgte bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C.

### 3.4.6 In situ Hybridisierung an Gefrierschnitten

Durch ISH kann die Expression verschiedener Gene regionspezifisch in Gefrierschnitten analysiert werden, indem die mRNA, welche bei der Transkription entsteht, nachgewiesen werden kann (Emson, 1993). Eine Liste der verwendeten Sonden und deren Hybridisierungstemperaturen befinden sich in Tabelle 10 (Anhang 9.2.3).

#### 3.4.6.1 Silanisieren der Deckgläschen

Da RNA gut an Silikate bindet war es notwendig, die verwendeten Deckgläser zu silanisieren. Dazu wurden die Deckgläschen (22 mm x 50 mm; Mentzel) zunächst 5 sec in Dichlorodimethylsilane getaucht, anschließend 5 sec in Aceton und schließlich für 5 sec in 100 % EtOH. Die Deckgläschen wurden zum trocknen unter einem Abzug aufgestellt und danach bei 180 °C für 6 h gebacken, um eine mögliche Kontamination mit RNAsen zu reduzieren.

#### 3.4.6.2 Vorbereitungen der Gewebeproben

Die embryonalen Gehirne, welche für *in situ* Hybridisierung verwendet werden sollten, wurden stets nach der Präparation ü.N. in 4 % PFA/HBSS fixiert und anschließend jeweils ü.N. in 12 %, 15 % und 18 % RNase-freier Sucrose in HBSS inkubiert. Danach folgte das Einfrieren mit flüssigem N<sub>2</sub> und eine Lagerung bei -80 °C. Für die ISH wurden Koronalschnitte angefertigt (siehe 3.3.3), die ebenfalls bei -80 °C lagerten. Vor dem Gebrauch mussten die Schnitte 1h auf einer Heizplatte bei 55 °C getrocknet werden.

#### 3.4.6.3 Fixierung und Permeabilisierung des Gewebes

Vor der Hybridisierung wurden die Schnitte abermals 10 min in PFA/PBS<sub>DT</sub> fixiert, um RNase-Kontamination zu reduzieren und die histologische Struktur zu erhalten. Es folgte ein dreimaliges Waschen für 5 min in PBS<sub>DT</sub>/0,2 % TritonX. Zur Destabilisierung der Zellmembranen wurden die Schnitte 10 min in 0,2 M HCl inkubiert und anschließend wieder zweimal 5 min gewaschen. Zur Reduktion des Hintergrundes diente eine zehnminütige Acetylierung des Gewebes in 5 mM Acetanhydrid/0,1 M TEA. Nach wiederholten Waschen (2X 5min) wurden die Schnitte 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> gespült und anschließend auf einer Heizplatte bei 55 °C für 30 min getrocknet.

#### 3.4.6.4 Hybridisierung von RNA-Sonden

Bei der Hybridisierung bindet eine Digoxigenin-markierte Sonde unter stringenten Bedingungen an ihre komplementäre Ziel-mRNA im Gewebeschnitt. Die Hybridisierungstemperatur (HT) lässt sich dabei durch mehrere Faktoren beeinflussen:

- Je länger die Sonde, desto höher die HT
- Guanine und Cytosine erhöhen, Thymidine und Adenosine senken die HT
- Salze erhöhen die HT, indem die positiven Ionen das negative Phosphatgerüst der Nukleotide sättigen und dadurch eine elektrostatische Abstoßung von Sonde und Zielsequenz verhindern
- Adjuvantien wie Formamid (FA) destabilisieren die Hybridbildung und senken die HT
- Es paaren sich auch Einzelstränge, die nicht vollständig komplementär sind, was wiederum die HT verringert (*missmatch*)
- Manche Hybride sind von ihren chemischen Eigenschaften her stabiler als andere (RNA-RNA-Hybride sind stabiler als DNA-RNA-Paarungen)

Die verwendeten Sonden und deren Hybridisierungstemperaturen sind der Tabelle 10 (Anhang 9.2.3) zu entnehmen. Die Hybridisierungstemperaturen wurden nach folgender Formel berechnet (Wahl et al., 1987):

$$HT = 79,8 + 18,5 \cdot \log M + 58,5 \cdot (\%GC) + 11,8 \cdot (\%GC)^2 - 820/L - 0,35 \cdot (\%FA) - 25$$

Dabei entspricht  $\log M$  der molaren Konzentration einwertiger Kationen, % GC dem Anteil der Basen Guanin und Cytidin als Molenbruch, L ist die Länge der Sonde in bp und % FA der Zahlenwert des Anteils von Formamid in der respektiven Hybridisierungslösung. Die 25 spiegelt einen thermischen Korrekturfaktor wieder, der sich aus der Markierung der Sonden mit Digoxigenin, sowie den chemischen Eigenschaften von RNA-RNA-Hybriden und der potentiellen Fehlpaarung von 12,5 % ergibt.

Die Hybridisierungslösung A (0,4 mg/ml Torula RNA, 0,1 mg/ml tRNA) wurde mit 900 ng Sonde (3 ng/ $\mu$ l) vermischt und 3 min bei 99 °C denaturiert. Die Lösung wurde kurz auf Eis abgeschreckt, bevor die Hybridisierungslösung B (0,05 % FA, 10 mM EDTA, 3X SCC, 1X Denhardts, 1 % Dextransulfat) dazugegeben und der gesamte Ansatz auf HT erhitzt wurde. Danach wurden jeweils 300  $\mu$ l der Lösung auf die getrockneten Schnitte aufgebracht und diese mit einem silanisierten Deckgläschen (siehe 3.4.6.1) abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei HT in einer abgedichteten feuchten Kammer, die mit 50 % FA/1 x SSC befüllt war. Am nächsten Tag mussten zunächst die Deckgläschen vorsichtig in 5X SCC abgelöst werden, ohne das Gewebe zu beschädigen. Es folgten mehrere Waschschrte bei HT, um ungebundene Sonde zu entfernen und die FA-Konzentration zu verringern. Dabei wurden die Schnitte zunächst 30 min in 50 % FA/1X SCC inkubiert, dann 20 min in 2X SCC und schließlich zweimal 20 min in 0,2X SCC. Danach erfolgte die Detektion der Hybride.

#### 3.4.6.5 Detektion der Hybride

Für die Detektion der Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte eine Umpufferung, wofür die Schnitte dreimal 5 min in MaBT gespült wurden. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu reduzieren, erfolgte eine einstündige Blockierung bei RT in 2 % Blocking reagent (Roche). Danach wurden die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C mit einem anti-DIG Fab-Fragment Antikörper inkubiert, welcher mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert vorlag (Roche). Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal 10 min in MaBT gespült und schließlich 10 min in Reaktionspuffer inkubiert, dem zur Inhibition endogener alkalischer Phosphatasen eine Spatelspitze Levamisol (Roth) hinzugefügt wurde. Danach erfolgte der kolorimetrische Nachweis durch den Umsatz von je 0,4 mM der Substanzen Nitroblau-Tetrazoliniumblau (NBT, Roche) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP, Roche) in Reaktionspuffer, die direkt auf die Schnitte

gegeben wurden. BCIP dient der alkalischen Phosphatase als Substrat und wird nach der Dephosphorylierung zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert. Dabei stellt NBT das Oxidationsmittel dar, welches zu einem unlöslichen Diformazan reduziert wird. Der kolorimetrische Nachweis fand in einer feuchten Kammer bei RT unter Lichtausschluss statt. Die Farbreaktion wurde durch das Spülen im PBS beendet und die Schnitte in Mowiol eingebettet.

#### **3.4.7 Herstellung von cDNA-Bibliotheken aus Einzelzellen und Axonen**

Durch die limitierte Synthese und Amplifikation der isolierten RNA aus Einzelzellen wurden repräsentationsgetreue cDNA-Bibliotheken hergestellt und hinsichtlich der Expression verschiedener Zielgene klassifiziert. Die Isolation einzelner kortikaler Zellen und ausgewachsener thalamischer Axone sowie die Erstellung der cDNA-Bibliotheken wurden freundlicherweise von Daniel Pensold nach einem Protokoll von Dr. Natja Haag (Institut für Biochemie I, Universität Jena) durchgeführt (Pensold et al., submitted).

##### **3.4.7.1. Isolierung mittels Mikromanipulation**

In dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil kortikaler Einzelzellen analysiert. Dazu wurden manuell und unter visueller Kontrolle einzelne kortikale Zellen aus Einzelzellsuspensionen isoliert, die wie unter 3.2.3 beschrieben angefertigt wurden. Jedoch erfolgte die Präparation nicht in GBSS, sondern in HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , um ein Adhären der Zellen zu vermeiden. Die manuelle Isolation erfolgte mit Hilfe eines Mikroinjektors CellTram® vario (Eppendorf) an einem inversen Durchlichtmikroskop (CellObserver; Carl Zeiss Microscopy). Die Zellen wurden mit einer ausgezogenen, feuerpolierten, FBS-beschichteten Kapillare (außen-Ø 1 mm, Wanddicke 0,13-0,22 mm; Science products) aufgenommen, zweimal in HBSS/1 % FBS gespült und schließlich in ein Reaktionsgefäß mit Lysepuffer überführt, das sofort bis zur weiteren Verwendung in flüssigem  $\text{N}_2$  eingefroren wurde. Die Axone mussten zunächst einen Tag auswachsen, bevor sie nach demselben Verfahren mit einer Kapillare unter Sichtkontrolle vom Deckglas abgekratzt werden konnten (Abbildung 18 B).

##### **3.4.7.2 Reverse Transkription und Polyadenylierung**

Zuerst war die Synthese des Erststranges notwendig. Der Lysepuffer, in dem die Zellen aufbewahrt wurden, beinhaltete bereits 1X Transkriptionspuffer für gute enzymatische Bedingungen, sowie 10  $\mu\text{M}$  dNTPs und 3,5 nM SRT<sub>24</sub>-Primer. Zunächst erfolgte die Lyse der isolierten Zellen bei 65 °C für 90 sec, bevor die Proben auf 42 °C herabgekühlt und 100 U RevertAid™ H Minus M-MuLV reverse Transkriptase (Fermentas) direkt in den Ansatz gegeben wurde. Die limitierte, reverse Transkription erfolgte 15 min bei 42 °C, mit einer anschließenden

Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C. Um den SRT<sub>24</sub>-Primer auch für die Amplifikation des Gegenstranges zu verwenden, war eine Polyadenylierung am 5'-Ende erforderlich. Dazu musste zunächst die mRNA von den RNA/DNA-Hybriden entfernt werden, was durch eine Zugabe von 5 U RNase H (New England Biolabs) und 9 mM MgCl<sub>2</sub> und einer anschließenden Inkubation für 15 min bei 37 °C realisiert wurde. Es erfolgte eine Denaturierung der cDNA-Stränge für 2 min bei 95 °C und ein schnelles Abkühlen auf 4 °C, um eine Renaturierung der Stränge zu vermeiden. Für die Polyadenylierung wurden 5 mM Kalium-Phosphat (pH 7.0) und 750 µM dATP, sowie 10 U terminale Transferase (New England Biolabs) in den Ansatz gegeben und dieser zuerst für 15 min bei 37 °C inkubiert, anschließend 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und dann bis zum weiteren Gebrauch auf 4 °C abgekühlt.

#### **3.4.7.3 Amplifikation der limitierten 3'cDNA**

Da eine Zelle mit lediglich 0,5 bis 1,5 ng mRNA (Kurimoto et al., 2006) nur wenig Ausgangsmaterial liefert, war eine Amplifikation mittels PCR erforderlich, um genug Material für die weitere Analyse zu generieren. Dazu musste die cDNA zunächst in drei individuelle Ansätze aufgeteilt werden, um Amplifikationsunterschiede zu mitteln und sicherzustellen, dass auch niedrig abundante Transkripte amplifiziert werden. Ein Reaktionsansatz enthielt 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween20, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 200 µM dNTP, 10 µM SRT<sub>24</sub>-Primer 2,5 U HotStart Taq-DNA-Polymerase (Genaxxon bioscience) und 0,05 U HotStart Pfu Turbo DNA-Polymerase (Agilent Technologies). Die HotStart Taq-Polymerase wurde zunächst 2 min bei 95 °C aktiviert, dann folgte die Hybridisierung der Primer für 2 min bei 52 °C und schließlich die Elongation für 2 min bei 72 °C. Nach 35 Zyklen erfolgte eine finale Elongation bei 72 °C für 10 min, bevor die Ansätze auf 4 °C herab gekühlt und wieder vereinigt wurden. Die Proben wurden bis zur Klassifizierung bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.8 Mikroskopie und statistische Auswertung**

##### **3.4.8.1 Mikroskopie**

Die Detektion fluoreszierender Farbstoffe erfolgte mit Hilfe eines konfokalen *Laser scanning* Mikroskops TCS SP5 (Leica), während die durchgeführten *in situ* Hybridisierungen mit einem Transmissionsmikroskop BX40 (Olympus) und einer digitalen Kamera DP70 (Olympus) dokumentiert wurden. Die manuelle Isolation kortikaler Einzelzellen erfolgte an einem inversen Durchlichtmikroskop (CellObserver; Carl Zeiss Microscopy).



#### **3.4.8.2 Datenanalyse**

Für die weitere Bearbeitung mikroskopischer Bilder wurde das Programm Adobe Photoshop CS (Version 7.0) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ImageJ-Software (W. S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; 1997–2006). Es wurden stets Ausschnitte aus dem somatosensorischen Kortex zur Analyse verwendet.

#### **3.4.8.3 Statistik**

Für die Durchführung des zweiseitigen, studentischen T-Tests sowie für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das *Office*-Programm Excel 2007 (Microsoft) genutzt. Der *two-way* ANOVA wurde mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM durchgeführt. Alle angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert (MW)  $\pm$  SEM. Das statistische Signifikanzniveau für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde wie folgt definiert: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Die Anzahl  $n$  bezieht sich, wie unter den respektiven Abbildungen angegeben, auf die analysierten Schnitte, Zellen oder Explantate, aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

## 4 Ergebnisse

Die Entwicklung des zerebralen Neokortex ist abhängig vom präzisen Zusammenspiel verschiedenster entwicklungsrelevanter Prozesse, zu denen Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose zählen. Die Balance zwischen Zellteilung und Ausdifferenzierung neuronaler Vorläuferzellen ist streng reguliert und schon geringe Abweichungen können zerebrale Fehlbildungen und Neurodegeneration zur Folge haben (Chenn and Walsh, 2002; Kuida et al., 1998; Rakic et al., 2009). Deshalb ist es von wissenschaftlichem Interesse zu verstehen, wie die Proliferation und Identität neuronaler Vorläuferzelle reguliert wird und welche intrinsischen und extrinsischen Faktoren die individuelle Entwicklung eines kortikalen Neurons beeinflussen. In dieser Arbeit werden erste Evidenzen für eine regulatorische Funktion des Signalmoleküls EphrinA5 während der embryonalen Schichtenbildung präsentiert.

Vorrausgegangene Experimente haben bereits belegt, dass EphrinA5-defiziente Mäuse eine Verschiebung der kortikalen Schichtung aufweisen (Gerstmann et al., 2010). Da bisher nur wenig über den Einfluss von Ephrinen auf die kortikale Schichtenbildung bekannt ist, wurde die Bedeutung des Signalmoleküls EphrinA5 auf die Ausbildung der laminaren Organisation anhand einer *loss of function* Mausmutante untersucht, um herauszustellen, welche Mechanismen dieser Schichtenverschiebung zugrunde liegen.

### 4.1 Adulte EphrinA5-defiziente Mäuse weisen eine persistente Verschiebung der laminaren Organisation auf

Vorrausgegangene Untersuchungen an EphrinA5-defizienten Mäusen (KO) und vergleichbaren Wildtyptieren (WT) konnten bereits belegen, dass die laminare Architektur in den KO-Tieren verändert ist (Gerstmann et al., 2010). Unter Zuhilfenahme schichtenspezifischer Marker (Abbildung 5 A, B) wurde die laminare Organisation des adulten somatosensorischen Kortex (Bregma=0; Interaural=3,8 mm) visualisiert und vermessen. Der Transkriptionsfaktor Cux-1 wird exklusiv in Neuronen der infragranulären Schichten 2/3 und 4 exprimiert (Nieto et al., 2004; Zimmer et al., 2004), während das Protein Otx-1/2 eine Subpopulation von Nervenzellen der infragranulären Schichten 5 und 6 markiert (Frantz et al., 1994). Zusätzlich wurde mittels DAPI-Kernfärbung die spezifische zelluläre Packungsdichte der kortikalen Schichten visualisiert. Dies ermöglichte die weitere Identifizierung und anschließende Analyse der radialen Ausdehnung einzelner kortikaler Schichten.

Die vergleichende Quantifizierung der Schichtdicken ergab in EphrinA5-defizienten Tieren eine Expansion der infragranulären Schichten, bei gleichzeitiger Reduktion der superfiziellen Schichten (Abbildung 5 C). Die oberen Schichten 2/3 und 4 nahmen im WT insgesamt 40,9 % ( $\pm 1,4$  %) der

radialen Ausdehnung des Neokortex ein, während sie im KO lediglich 35,9 % ( $\pm 1,3$  %) ausmachten (WT  $n=16$ , KO  $n=13$ ; T-Test,  $** p<0,01$ ). Das entsprach einer Reduktion der superfiziellen Schichten um 5 % in den EphrinA5-defizienten Mäusen. Im Gegensatz dazu nahmen die tiefen Schichten 5 und 6 im WT insgesamt 51,5 % ( $\pm 1,5$  %) der laminaren Architektur ein, während der Anteil im KO um 5 % vergrößert war und 56,2 % ( $\pm 1,2$  %; T-Test,  $** p<0,01$ ) des gesamten Kortex einnahm. Die Gesamtdicke des zerebralen Kortex EphrinA5-defizienter Mäuse wies dabei keine signifikanten Veränderungen zu vergleichbaren Kontrolltieren auf (Abbildung 5 D). Die Daten zeigen, dass der Funktionsverlust von EphrinA5 eine persistente Verschiebung der adulten kortikalen Zytoarchitektur verursacht. Jedoch wurden weder ektopische Cux-1 positive Zellen in den infragranulären Schichten detektiert, noch Otx-1/2-reaktive Zellen in den superfiziellen kortikalen Schichten lokalisiert, was darauf hinweist, dass die generelle kortikale Zytoarchitektur EphrinA5-defizienter Mäuse intakt ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Ligand EphrinA5 in die korrekte Ausbildung der kortikalen Schichtung involviert ist. Diese entwicklungsrelevante Funktion sollte im Folgenden weiter untersucht und charakterisiert werden.

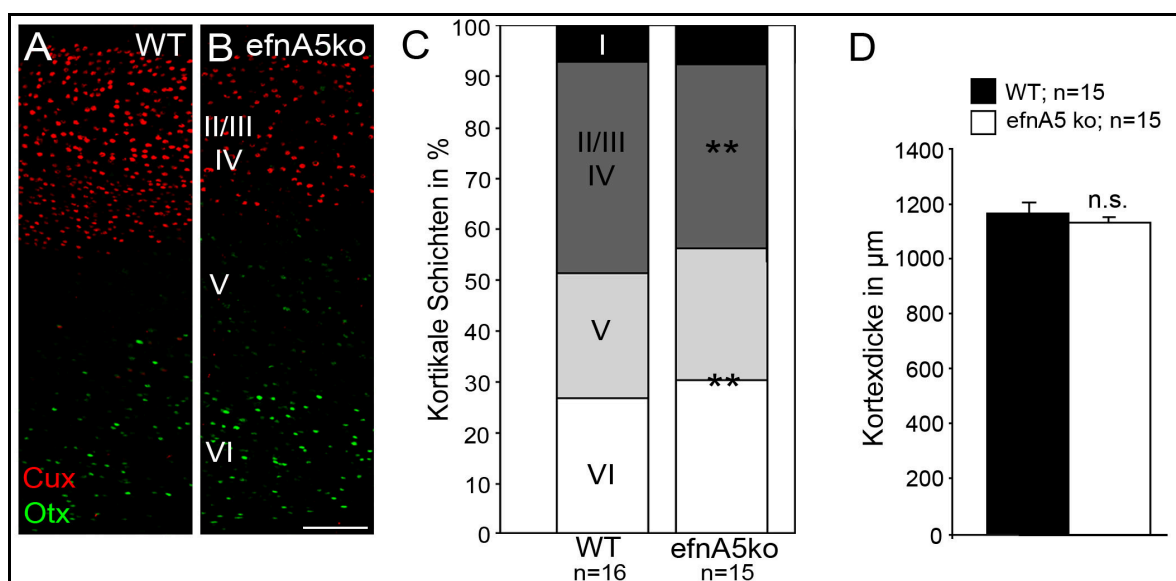


Abbildung 5: EphrinA5-Defizienz verursacht eine persistente Verschiebung der kortikalen Organisation. Die Analyse der radialen Ausdehnung einzelner kortikaler Schichten wurde auf den somatosensorischen Kortex (Bregma=0; Interaural=3,8 mm) begrenzt. Immunhistochemische Markierungen gegen Cux-1 (rot, Schicht 2/3 und 4) und Otx-1/2 (grün, Schicht 5 und 6) in WT (A) und KO (B) deuteten auf eine Verschiebung der kortikalen Organisation in efnA5-defizienten Mäusen hin. Die quantitative Analyse (C) ergab in EphrinA5-defizienten Mäusen eine Expansion der infragranulären Schichten 5 und 6, bei einer gleichzeitigen Reduktion der supragranulären Schichten 2/3 und 4. Die gesamte radiale Ausdehnung des Kortex wies keine signifikanten Veränderungen auf (D). Resultate aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: 100 µm; T-Test,  $**p<0,01$  (MW $\pm$ SEM); n=Anzahl der analysierten Ausschnitte.

#### **4.2 EphrinA5-defiziente Mäuse weisen eine veränderte Anzahl postmitotischer Neurone während der Bildung der infragranulären und supragranulären Schichten auf**

Die Bildung der exzitatorischen Projektionsneurone erfolgt in einer distinkten zeitlichen Abfolge (Polleux et al., 1997; Takahashi et al., 1999). Während der frühen Neurogenese (E11-E14) werden die Neurone der infragranulären Schichten generiert, wohingegen an späteren Entwicklungszeitpunkten (E15-E18) Nervenzellen der supragranulären Schichten hervorgebracht werden. Die Expansion der infragranulären Schichten in den EphrinA5-knockout Mäusen deutet auf eine erhöhte Produktion exzitatorischer Neurone im Verlauf der frühen Neurogenese hin, während die Reduktion der oberen Schichten auf eine verminderte Generierung postmitotischer Zellen zur späten Kortextentwicklung hinweist. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die Anzahl mitotisch aktiver Zellen im dorsolateralen Kortex analysiert (Abbildung 6 A), welche zur frühen Neurogenese an E 13,5 sowie an einem späteren Entwicklungszeitpunkt an E16,5 den Zellzyklus verlassen haben und ausdifferenzierten.

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, wie viele Zellen während der Generierung der tiefen Schichten an E13,5 den Zellzyklus verlassen haben, wurden koronale Gehirnschnitte von embryonalen EphrinA5-knockout Mäusen und vergleichbaren Kontrolltieren angefertigt und eine immunhistochemische Markierung gegen Tbr1 durchgeführt (Abbildung 6 B, C). Tbr1 wird von Pionierneuronen der Subplatte und Nervenzellen der unteren kortikalen Schichten exprimiert und kann somit an E13,5 als Marker für junge postmitotische Neurone der kortikalen Platte verwendet werden (Englund et al., 2005; Kolk et al., 2005). Die Anzahl postmitotischer Neurone korreliert mit der radialen Ausdehnung der kortikalen Platte und liefert einen Hinweis darauf, wie viele Vorläufer während der frühen Neurogenese den Zellzyklus verlassen haben. Die Analyse verdeutlicht, dass EphrinA5-defiziente Mäuse an E13,5 eine dickere kortikale Platte aufwiesen (Abbildung 6 D), was mit einer erhöhten Anzahl postmitotischer Zellen korrelierte. Die kortikale Platte nahm bei EphrinA5-defizienten Mäusen insgesamt 24,3 % ( $\pm 0,5$  %) der radialen Ausdehnung des embryonalen Kortex ein, während sie in gleichaltrigen Wildtypen lediglich 21,6 % ( $\pm 0,7$  %) der Gesamtdicke ausmachte. Somit war die kortikale Platte in den EphrinA5-knockout Tieren um 2,7 % dicker als in den Kontrolltieren (WT n= 46, KO n= 47; T-Test, \* p<0,05). Die ermittelte radiale Zunahme der kortikalen Platte in EphrinA5-knockout Mäusen korrelierte mit einer Zunahme postmitotischer Zellen. Die Quantifizierung deutet somit darauf hin, dass zur frühen Neurogenese an E13,5 eine erhöhte Anzahl postmitotischer Neurone in EphrinA5-defizienten Tieren generiert wird, die entsprechend ihres Bildungszeitpunktes die infragranulären kortikalen Schichten besiedeln.

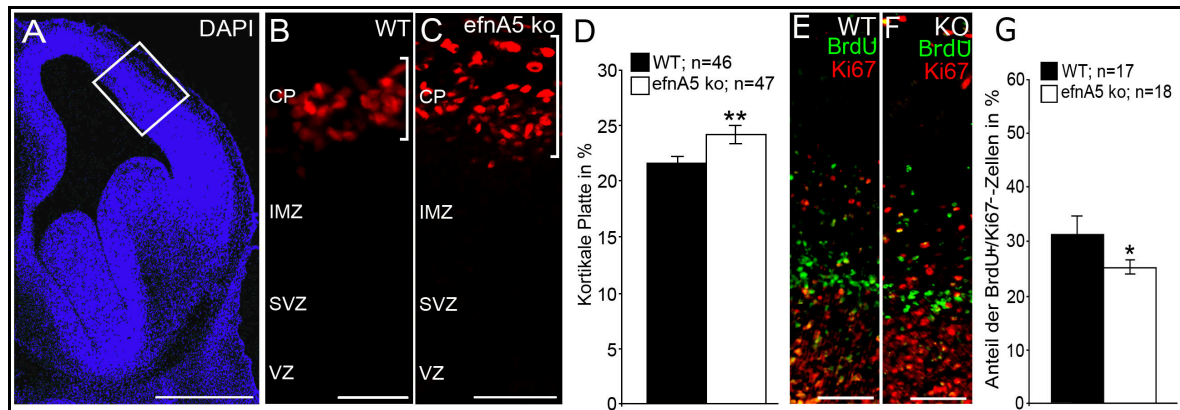


Abbildung 6: EphrinA5-defiziente Mäuse produzieren an E13,5 eine erhöhte Anzahl postmitotischer Neurone, während sie an E16,5 eine verringerte Austrittsrate aus dem Zellzyklus aufweisen. Analysiert wurde die Neuronenproduktion im dorsolateralen Kortex (A) zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (exemplarisch dargestellt an E14,5). Eine Antikörperfärbung gegen den Marker Tbr1 in WT (B) und KO (C) markiert junge Pionierneurone der CP. Die vergleichende Quantifizierung der radialen Ausdehnung der CP belegte, dass die kortikale Platte an E13,5 in EphrinA5-defizienten Mäusen dicker war als in gleichaltrigen Kontrolltieren (D), was mit einer erhöhten Anzahl Tbr1-positiver Neurone korrelierte. Dies deutet auf eine erhöhte Bildung postmitotischer Neurone zur frühen Neurogenese hin. Die Austrittsrate aus dem Zellzyklus an E16,5 wurde mit Hilfe von BrdU und Ki67-Färbungen bestimmt (E WT, F KO). Die Quantifizierung der BrdU-positiven/Ki67-negativen Zellen (G) ergab eine verminderte Austrittsraterate aus dem Zellzyklus in EphrinA5-defizienten Mäusen an E16,5, während der Bildung der oberen Schichten. CP=kortikale Platte, IMZ=Intermediärzone, SVZ=Subventrikularzone, VZ=Ventrikularzone; Resultate aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: A 500 µm; B, C, E, F 100 µm; T-Test, \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (MW±SEM); n=Anzahl der analysierten Ausschnitte.

Als nächstes sollte die Austrittsrate aus dem Zellzyklus zur späten Neurogenese an E16,5 ermittelt werden, da zu diesem Entwicklungszeitpunkt Neurone der supragranulären Schichten gebildet werden. Da die Tbr1-Expression in den infragranulären Schichten erhalten bleibt und diese zu späteren Entwicklungszeitpunkten bereits vorhanden sind, war die Quantifizierung der jungen postmitotischen Projektionsneurone mittels Tbr1 nicht möglich. Deshalb wurde durch sogenannte *birthdating* Experimente die Anzahl jener Zellen ermittelt, die zur späten Neurogenese den Zellzyklus verlassen haben. Dazu wurde schwangeren Versuchstieren an E16,5 das Thymidinanalogon BrdU injiziert. BrdU ist ein Teilungsmarker der während der S-Phase in die DNA mitotisch aktiver Zellen interkaliert und später immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Kee et al., 2002). 24 Stunden nach der BrdU-Injektion wurden die embryonalen Gehirne isoliert und Antikörpermarkierungen gegen das verabreichte BrdU und zusätzlich gegen den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt (Abbildung 6 E, F). Von Interesse war der Anteil an BrdU-positiven/ Ki67-negativen Zellen, da diese zum Zeitpunkt der Injektion mitotisch aktiv waren, aber innerhalb der folgenden 24 Stunden aus dem Zellzyklus ausgetreten sind (Kee et al., 2002). Die Analyse ergab einen verminderten Anteil BrdU-positiver/Ki67-negativer Zellen in den EphrinA5-knockout Tieren, was auf eine verringerte Neuronenproduktion während der Bildung der

supragranulären Schichten hindeutet (Abbildung 6 G). Insgesamt wurde in den Wildtyp-Tieren ein Anteil von insgesamt 32,94 % ( $\pm 2,0$  %) BrdU-positiver/Ki67-negativer Zellen ermittelt. Im Gegensatz dazu stellte sich im KO eine Reduktion um 6,9 % auf insgesamt 26,1 % ( $\pm 1,7$  %) BrdU-positiver/Ki67-negativer Zellen heraus (WT n=22, KO n=28; T-Test, \*  $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die EphrinA5-defizienten Tiere zur frühen Neurogenese an E13,5 eine erhöhte Anzahl postmitotischer Neurone für die tiefen Schichten generieren und zur späteren Kortexentwicklung an E16,5 eine verringerte Anzahl Projektionsneurone für die superfiziellen Schichten produzieren. Diese Resultate sind konsistent mit der persistenten Verschiebung der kortikalen Organisation in adulten EphrinA5-defizienten Mäusen. Die Daten stützen somit die Hypothese, dass EphrinA5 in die Regulation von Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen involviert ist und dadurch die Ausbildung der kortikalen Architektur beeinflusst.

#### **4.3 EphrinA5 reguliert die Anzahl und Identität von apikalen und basalen Vorläuferzellen**

Die persistente Verschiebung der adulten kortikalen Zytoarchitektur könnte mit einer Verschiebung der kortikalen Vorläufer korrelieren, da diese, je nach Lage und Identität, Projektionsneurone für verschiedene Schichten hervorbringen. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde im Folgenden die Verteilung und Identität der proliferativen Zellen analysiert. Zunächst sollte eine Markierung gegen mitotisch aktive Zellen die generelle Anzahl neuronaler Vorläufer in den transienten proliferativen Zonen visualisieren. Die Immunfärbung wurde an E16,5 durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Unterscheidung zwischen den beiden transienten proliferativen Zonen VZ und SVZ möglich war. Anhand einer Antikörpermarkierung gegen den Proliferationsmarker Ki67 wurde die Anzahl markierter Zellkörper in der Ventrikularzone und Subventrikularzone quantifiziert, da hier die apikalen, beziehungsweise basalen Vorläuferzellen lokalisiert sind (Abbildung 7 A, B).

Im Vergleich zu Kontrolltieren wurde in EphrinA5-defizienten Mäusen ein erhöhter Anteil mitotisch aktiver Zellen in der Ventrikularzone detektiert, während gleichzeitig ein verringerter Anteil an Vorläufern in der Subventrikularzone ermittelt wurde (Abbildung 7 C). In wildtypischen Kontrolltieren wurden 72,3 % ( $\pm 2,8$  %) aller Ki67-reaktiven Zellen in der VZ detektiert, während 26 % ( $\pm 2,6$  %) in der SVZ und ein geringer Anteil von 1,7 % ( $\pm 0,4$  %) in der IMZ ermittelt wurden. Vergleichend dazu konnte in EphrinA5-defizienten Mäusen mit 79,6 % ( $\pm 1,8$  %) ein erhöhter Anteil proliferierender Zellen in der VZ detektiert werden, bei einer gleichzeitig reduzierten Prozentzahl von 19,7 % ( $\pm 1,8$  %) in der SVZ und einem minimalen Anteil von 0,7 % ( $\pm 0,2$  %) mitotisch aktiver Vorläufer in der IMZ (WT n=22, KO n=29; T-Test, \*  $p < 0,05$ ). Die veränderten

Anteile proliferierender Zellen in VZ und SVZ deuteten bereits auf eine relative Erhöhung der Anzahl an apikalen und eine Dezimierung der basalen Vorläuferzellen hin.

Apikale Vorläuferzellen sind in der Ventrikularzone (VZ) lokalisiert und bereits sehr früh während der Kortexentwicklung präsent. Sie werden durch die exklusive Expression des Transkriptionsfaktors Pax6 charakterisiert (Götz et al., 1998; Pontious et al., 2008). Im Gegensatz dazu werden die basalen Vorläufer erst im Verlauf der Neurogenese von apikalen Gliazellen durch asymmetrische proliferative Teilung generiert. Das Soma dieser Intermediärzellen befindet sich in der Subventrikularzone (SVZ) und sie werden durch die spezifische Expression des Markers Tbr2 charakterisiert (Englund et al., 2005; Pontious et al., 2008). Um die Anzahl und Identität kortikaler Vorläuferzellen in EphrinA5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren zu untersuchen, wurden koronale Gehirnschnitte mit spezifischen Antikörpern gegen Pax6 und Tbr2 immunhistochemisch angefärbt. Zur quantitativen Analyse wurden dorsolaterale Kortexausschnitte in 20 horizontale Segmente unterteilt und die Zellzahl in den einzelnen Sektionen gezählt, beginnend mit Segment 1 am Ventrikel und Nummer 20 an der Kortexoberfläche. Die ermittelte Anzahl an apikalen und basalen Vorläuferzellen wurde in den jeweiligen Segmenten zwischen WT und KO verglichen.

An E16,5 konnten in den EphrinA5-defizienten Mäusen ein erhöhter Anteil Pax6-positiver Zellen ermittelt werden (WT n=22, KO n=19; Two-way Anova, \*\*\*  $p < 0,001$ ; Abbildung 7 D, E). Die meisten apikalen Vorläufer waren sowohl im WT, als auch im KO im Segment 1 bis 8 lokalisiert. Jedoch verdeutlichte die Halbwertsbreite der Graphen die erhöhte Anzahl Pax6-positiver Vorläuferzellen in EphrinA5-knockout Mäusen. Im WT wurde eine Halbwertsbreite von 5,41 Segmenten ermittelt, während der KO eine Halbwertsbreite von 6,49 Segmenten aufwies (Abbildung 7 D). Im Gegensatz dazu wurde in EphrinA5-knockout Tieren im Vergleich zum WT eine verminderte Anzahl Tbr2-reaktiver, basaler Vorläuferzellen detektiert (WT n=20, KO n=19; Two-way Anova, \*\*\*  $p < 0,001$ ; Abbildung 7 F, G). Die Kurvenverläufe visualisieren, dass die meisten Tbr2-reaktiven basalen Intermediärzellen sowohl im WT, als auch in EphrinA5-defizienten Mäusen in Segment 2 bis 11 ermittelt wurden. Die resultierende Halbwertsbreite der ermittelten Graphen deutet auf die verminderte Anzahl basaler Vorläuferzellen hin und betrug im WT 7,5 Segmente und im KO lediglich 6,9 Segmente. Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass in EphrinA5-defizienten Mäusen eine veränderte Anzahl der embryonalen, mitotisch aktiven Zellen vorliegt. Es wurde eine erhöhte Anzahl an Pax6-positiven apikalen Vorläufern detektiert, bei einer gleichzeitigen Reduktion Tbr2-reaktiver basaler Intermediärzellen. Folglich scheint EphrinA5 kritisch für die Ausbildung der korrekten Anzahl und Identität apikaler und basaler Vorläuferzellen zu sein.

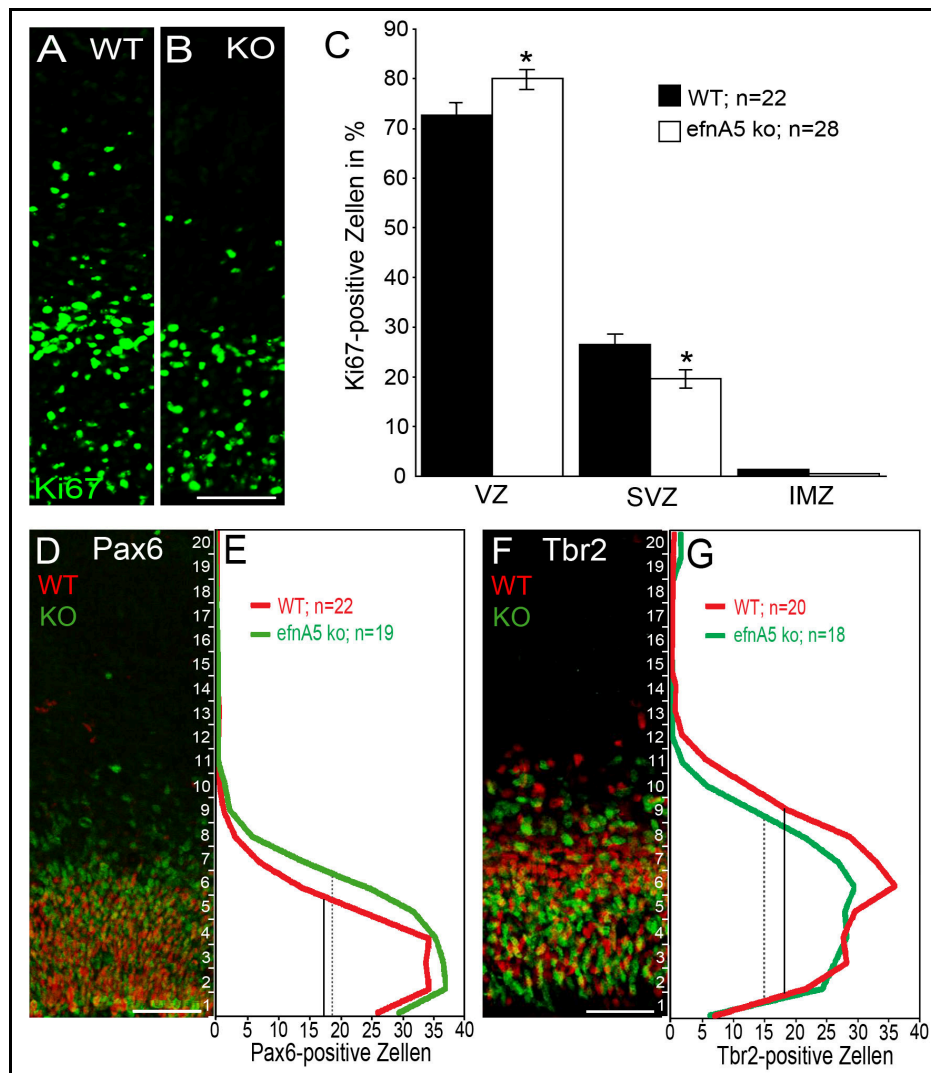


Abbildung 7: EphrinA5 reguliert die Anzahl und Identität kortikaler Vorläuferzellen. Eine immunhistochemische Markierung gegen den Proliferationsmarker Ki67 in WT (A) und EphrinA5-knockout Mäusen (B) färbt alle mitotisch aktiven Zellen. Die Quantifizierung (C) belegt, dass die EphrinA5-defizienten Tiere einen erhöhten Anteil an Vorläuferzellen in der VZ aufweisen, aber weniger proliferative Zellen in der SVZ besitzen. Das korreliert mit der Verteilung von spezifischen Vorläuferstypen. Der Transkriptionsfaktor Pax6 wird exklusiv in apikalen Vorläuferzellen exprimiert (D, WT=rot, KO=grün), während Tbr2 die basalen Intermediärzellen charakterisiert (F, WT=rot, KO=grün). Die Quantifizierung deutet an, dass EphrinA5-knockout Mäuse mehr apikale Vorläuferzellen besitzen (E) und eine verringerte Anzahl an basalen Intermediärzellen aufweisen (G), im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren. CP=Kortikale Platte; IMZ=Intermediärzone; SVZ=Subventrikularzone; VZ=Ventrikularzone; Resultate aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: 100  $\mu$ m; Two-way Anova, \*\*\* $p < 0,001$ ; (MW $\pm$ SEM); n=Anzahl der analysierten Ausschnitte.

#### 4.4 EphrinA5 beeinflusst die Teilungssymmetrie apikaler Vorläuferzellen und dadurch die Identität der generierten Tochterzellen

Die Teilungssymmetrie apikaler Vorläuferzellen korreliert mit dem Zellschicksal der generierten Tochterzellen (Götz and Huttner, 2005; Merot et al., 2009). Die korrekte Orientierung von Mitosespindel und Proliferationsebene sind dabei kritisch für den Teilungsmodus und die Identität



der resultierenden Tochterzellen. Durch symmetrische Teilung werden zwei identische Tochterzellen hervorgebracht, wohingegen asymmetrische Proliferation die Bildung unterschiedlicher Zelltypen fördert. Während der frühen Neurogenese, wenn die tiefen Schichten entstehen, werden postmitotische Zellen hauptsächlich durch asymmetrische neurogene Teilung apikaler Gliazellen gebildet. Deshalb sollte im Folgenden analysiert werden, ob die erhöhte Produktion von Projektionsneuronen, die in den EphrinA5-knockout Tieren an E13,5 ermittelt wurde, mit einer veränderten Teilungssymmetrie der proliferierenden Gliazellen assoziiert ist. Dazu wurden koronale Gehirnschnitte von EphrinA5-defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtypen angefertigt und immunhistochemisch gegen Aspm angefärbt (freundlicherweise von Prof. Wieland B. Huttner/MPI Dresden zur Verfügung gestellt). Zusätzlich wurden die Schnitte mit DAPI gefärbt (Abbildung 8 A). Aspm wird spezifisch in den Spindelpolen mitotisch aktiver Zellen akkumuliert (Asami et al., 2011; Kouprina et al., 2004). In Kombination mit DAPI war es möglich, den Teilungswinkel einzelner Zellen relativ zur Ventrikeloberfläche zu bestimmen (Abbildung 8 B, C). Ein kleiner Winkel (0-60°) wurde dabei als vertikale (symmetrische) Teilung definiert, wohingegen ein großer Winkel (60-90°) als horizontale (asymmetrische) Proliferation angenommen wurde. Analysiert wurden die Zellkörper direkt am Ventrikel, da hier die apikalen Gliazellen ihre Mitose vollziehen.

Die Analyse ergab, dass sich die meisten mitotisch aktiven Zellen in den Kontrolltieren vertikal teilten, mit einem Winkel zwischen 60° und 90° (Abbildung 8 D). Im Gegensatz dazu zeigten die EphrinA5-knockout Tiere eine verringerte vertikale Teilung, wohingegen ein größerer Anteil apikaler Vorläuferzellen eine asymmetrische Teilungsachse zwischen 0° bis 60° aufwies (Abbildung 8 E). Die genauen prozentualen Angaben sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Quantifizierung des Teilungswinkels deutet in EphrinA5-defizienten Mäusen auf eine Verschiebung der Teilungssymmetrie hin zur asymmetrischen Proliferation (Abbildung 8 F).

Tabelle 1: Die Quantifizierung der Teilungssymmetrie apikaler Vorläuferzellen deutet in EphrinA5-defizienten Mäusen eine Verschiebung zur asymmetrischen Proliferation an. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der ermittelten Teilungswinkel in WT und KO.

	<b>0-30°</b>	<b>30-60°</b>	<b>60-90°</b>
<b>WT (n=63)</b>	4,8 % (± 0,1 %)	31,7 % (± 0,2 %)	63,5 % (± 0,5 %)
<b>efnA5ko (n=36)</b>	13,8 % (± 0,2 %)	36,1 % (± 0,5 %)	50 % (± 0,4 %)

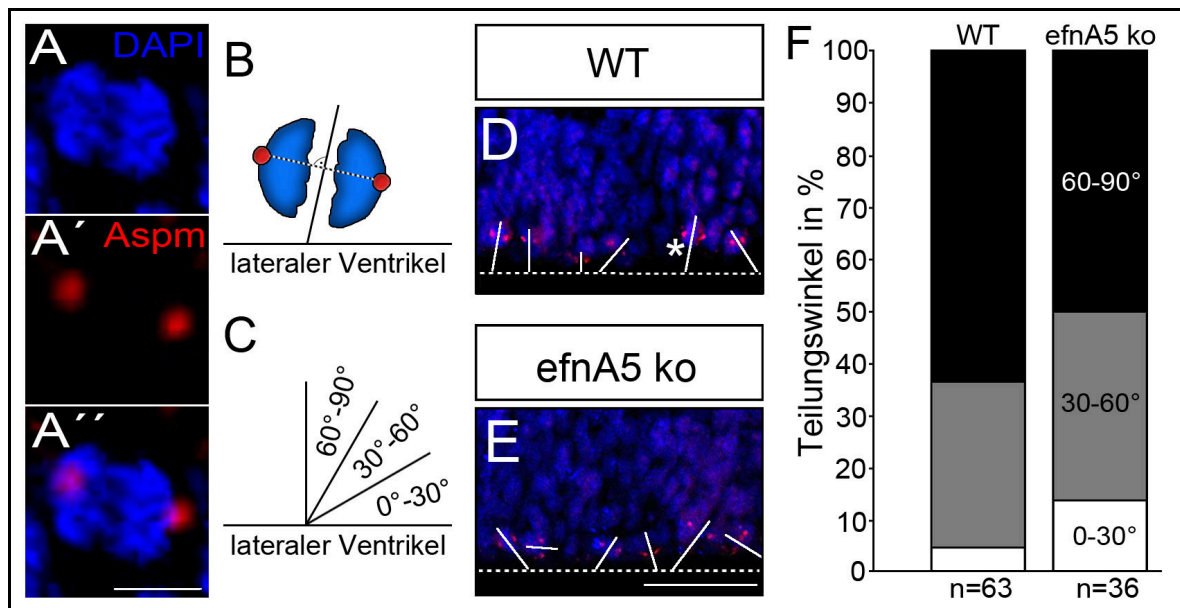


Abbildung 8: Die Anzahl asymmetrisch proliferierender apikaler Vorläuferzellen ist in EphrinA5-defizienten Mäuse erhöht. Die Teilungssymmetrie wurde anhand immunhistochemischer Markierungen gegen den Spindelpolmarker Aspm in Kombination mit einer DAPI-Kernfärbung bestimmt (A). Die Ebene zwischen den Spindelpolen steht im rechten Winkel zur Teilungsachse (B). Klassifiziert wurde das Verhältnis der Teilungsachse zum lateralen Ventrikel (C). Die apikalen Vorläuferzellen vollziehen ihre Mitose direkt am Ventrikel. Während im WT (D) die meisten apikalen Vorläufer eine vertikale Teilungsachse aufweisen (60-90°), proliferieren im KO (E) mehr Zellen asymmetrisch (0-30°). Die Quantifizierung (F) verdeutlicht, dass EphrinA5-defiziente Tiere eine Verschiebung der Teilungssymmetrie hin zur asymmetrischen Proliferation aufweisen. Resultate aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: A 5 µm, E 10 µm; n=Anzahl der analysierten Zellen.

Durch asymmetrische Proliferation werden sowohl postmitotische Neurone (asymmetrisch, neurogen), als auch basale Vorläuferzellen (asymmetrisch, proliferativ) erzeugt. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, welche Identität die generierten Tochterzellen aufweisen, die aus einer Zellteilung hervorgehen. Dazu wurde ein funktioneller *pair-cell* Assay durchgeführt, bei dem kortikale Vorläuferzellen aus wildtypischen Embryonen des Entwicklungstages E13,5 isoliert und als dissoziierte Einzelzellen in klonaler Dichte kultiviert wurden (Abbildung 9 A). Nach 24 Stunden entstanden durch Teilung Zellpaare (Abbildung 9 B), die hinsichtlich ihrer Identität immunzytochemisch auf die Expression von Nestin und  $\beta$ III-Tubulin untersucht wurden (Abbildung 9 C-E). Während Nestin ein intermediäres Filament darstellt, das in allen neuronalen Vorläuferzellen inklusive radialen Gliazellen vorkommt (Chanas-Sacre et al., 2000), wird  $\beta$ III-Tubulin spezifisch in postmitotischen Neuronen exprimiert (Tischfield and Engle, 2010). Jedes detektierte Zellpaar wurde als ein Proliferationsereignis angenommen, wobei jene, die mindestens ein postmitotisches Neuron enthielten, als neurogen zusammengefasst wurden, während die Pärchen mit zwei Nestin-reaktiven Zellen als proliferativ klassifiziert wurden. Um nun die Funktion von EphrinA5 *in vitro* zu untersuchen, erfolgte die Inkubation der kortikalen Vorläuferzellen unter

Zugabe von 5 µg/ml rekombinantem EphrinA5-Fc oder Fc-Kontrollprotein. Dieser Versuch stellt somit einen komplementären Ansatz zu der *loss of function* Mausmutante dar.

Die Kontroll-Fc behandelten kortikalen Vorläuferzellen teilten sich in 96,4 % ( $\pm 1,3$  %) aller detektierten Proliferationsereignisse neurogen und lediglich in 3,7 % ( $\pm 1,2$  %) proliferativ (Abbildung 9 F). Nach EphrinA5-Fc-Exposition wurden weniger  $\beta$ III-Tubulin-positive und mehr Nestin-reaktive Zellen detektiert als in den Kontrollen. Insgesamt 10,3 % ( $\pm 0,1$  %) aller detektierten Teilungsereignisse waren nach EphrinA5-Fc Stimulation proliferativ, während ein verringerter Anteil von 89,7 % ( $\pm 0,6$  %) als neurogene Zellteilung klassifiziert wurde (Kontroll-Fc n=191, efnA5-Fc n=233; T-Test, \*p<0,05). Somit deutet die Quantifizierung auf eine Reduktion der neurogenen Teilung nach EphrinA5-Fc Stimulation um 23,8 % ( $\pm 0,6$  %) hin.

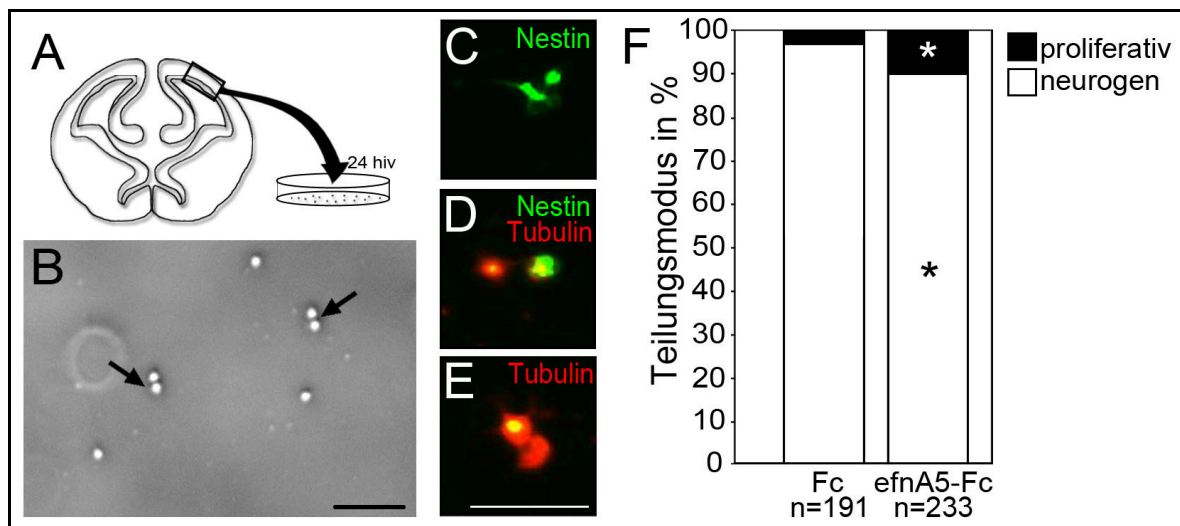


Abbildung 9: Die Stimulation kortikaler Vorläuferzellen mit rekombinantem EphrinA5-Fc an E13,5 erhöht den Anteil der sich proliferativ teilenden Vorläuferzellen. Um den Einfluss des Signalmoleküls EphrinA5 auf die Identität der Tochterzellen zu untersuchen, welche aus einem Teilungsereignis an E13,5 hervorgehen, wurde ein funktioneller *pair-cell* Assay durchgeführt. Dabei wurden kortikale Vorläuferzellen aus dem somatosensorischen Kortex wildtypischer Embryonen an E13,5 isoliert (A) und im Folgenden für 24 Stunden mit 5 µg/ml rekombinantem EphrinA5-Fc oder Kontroll-Fc kultiviert. Die aus Teilung hervorgegangenen Zellpaare (B) wurden immunhistochemisch hinsichtlich ihrer Identität mit spezifischen Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Nestin und dem neuronalen Marker  $\beta$ III-Tubulin untersucht (C-E). Dabei wurden durch proliferative Teilung entstandene Zellpaare detektiert, bei denen beide Tochterzellen den Proliferationsmarker Nestin exprimierten (C). Teilungsereignisse, aus denen ein Vorläufer und ein  $\beta$ III-Tubulin-positives Neuron (D), oder zwei  $\beta$ III-Tubulin-positive Neurone (E) entstammten, wurden dagegen als neurogen klassifiziert. Die Quantifizierung aller detektierten Proliferationsereignisse (F) verdeutlicht, dass nach Zugabe von rekombinantem EphrinA5-Fc eine reduzierte neurogene Proliferation ermittelt wurde. Resultate aus 2 unabhängigen Experimenten; Balken: 100 µm; T-Test, \*p<0,05 (MW $\pm$ SEM); n=Anzahl der analysierten Zellpaare.

Da dieses Experiment einen komplementären Ansatz zu den Untersuchungen in den EphrinA5-defizienten Mäusen darstellt, sind die Resultate übereinstimmend mit der erhöhten Anzahl postmitotischer Neurone, die im KO an E13,5 quantifiziert wurde. Die Daten deuten somit darauf hin, dass EphrinA5 in die Regulation der Zellteilung apikaler Vorläuferzellen involviert ist und dadurch die finale Anzahl basaler Intermediärzellen und ausdifferenzierter Projektionsneurone kontrolliert.

Desweiteren wurde auch die Zellteilung zur späten Neurogenese an E16,5 vergleichend untersucht, da zu diesem Zeitpunkt die oberen Schichten gebildet werden. Die mitotisch aktiven Zellen verbrauchen sich an späteren Entwicklungszeitpunkten durch terminale, neurogene Teilung und produzieren dadurch den Großteil an postmitotischen Neuronen der superfiziellen Schichten (Götz and Huttner, 2005). Terminal neurogen proliferierende Vorläuferzellen zeichnen sich durch die exklusive Expression des Neurogens Insm-1 aus (Farkas et al., 2008; Rosenbaum et al., 2011). Deshalb wurde mit Hilfe einer *in situ* Sonde gegen Insm-1 (freundlicherweise von Prof. Wieland B. Huttner/MPI Dresden zur Verfügung gestellt) die Anzahl an symmetrisch neurogen proliferierenden Zellen in WT (Abbildung 10 A, C) und KO (Abbildung 10 B, D) untersucht. Zur vergleichenden Analyse wurden Intensitätsmessungen von vertikalen Ausschnitten aus dem dorsolateralen Kortex an E16,5 erstellt und auf den Hintergrund normalisiert (Abbildung 10 E). Die resultierenden Kurvenverläufe verdeutlichen, dass in EphrinA5-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren ein reduzierter Bereich der Insm-1 Expression detektiert wurde (WT n=23, KO n=21; Two-way Anova, \*\*\*  $p < 0,001$ ). Man kann in den Kurven zwei Maxima im Bereich der proliferativen Zonen VZ und SVZ erkennen, da hier terminal proliferierende Vorläuferzellen lokalisiert sind. In den EphrinA5-knockout Tieren ist das Maximum in der SVZ jedoch deutlich schmaler, was auch durch die ermittelten Halbwertsbreiten widerspiegelt wird. In wildtypischen Kontrolltieren wurde eine Halbwertsbreite von 14,6 ermittelt, während diese in EphrinA5-defizienten Mäusen lediglich 10,7 betrug. Die Ergebnisse deuten auf eine verringerte terminale Teilung in der SVZ EphrinA5-defizienter Mäusen während der Bildung der oberen Schichten hin, was mit der verringerten Austrittsrate aus dem Zellzyklus an E16,5 korreliert (Abbildung 6 E-G).

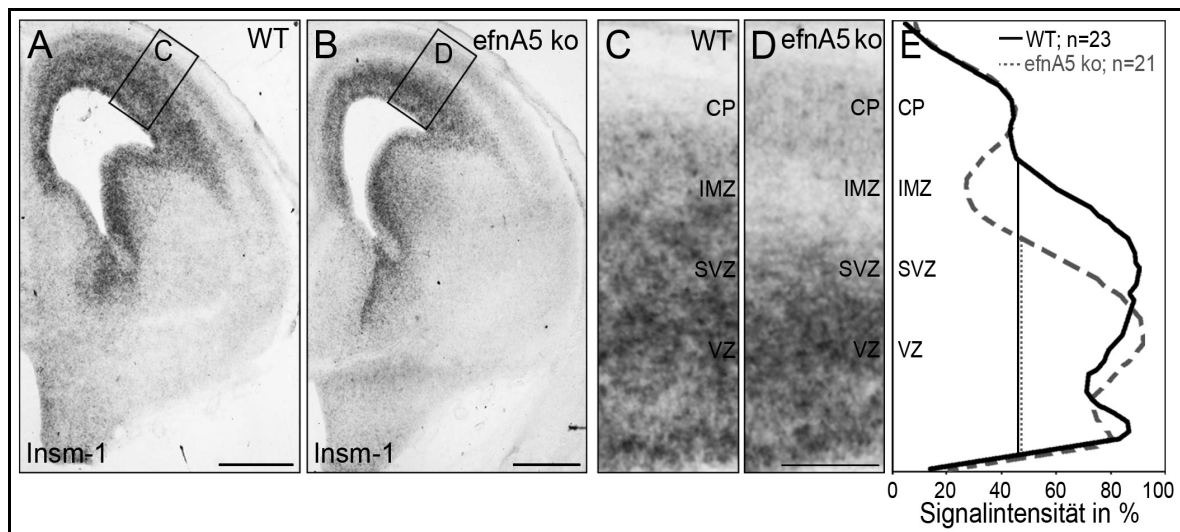


Abbildung 10: Die symmetrische, terminale Teilung ist in EphrinA5-defizienten Mäusen an E16,5 reduziert. Um Vorläufer zu identifizieren, die bei der nächsten Teilung zwei postmitotische Neurone generieren, wurde eine *in situ* Hybridisierung gegen das Neurogen Insm-1 durchgeführt. Die Markierung ergab im WT (A) und KO (B) ein deutliches Signal in den transienten proliferativen Zonen. Zur Quantifizierung wurden vertikale Intensitätsmessungen von Ausschnitten aus dem dorsolateralen Kortex von WT (C) und KO (D) erstellt und auf den Hintergrund normalisiert. Die ermittelten Kurvenverläufe (E) zeigen zwei Intensitätsmaxima in den proliferativen Zonen VZ und SVZ, wo terminal proliferierende Vorläuferzellen lokalisiert sind. Die ermittelten Graphen deuten an, dass die terminal neurogene Teilung in den EphrinA5-defizienten Mäusen (grau gestrichelt) im Vergleich zum WT (schwarz) reduziert ist. Besonders in der SVZ, wo die basalen Intermediärzellen residieren, wurde eine Reduktion des *in situ* Signals im KO verzeichnet. Resultate aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: A, B 500 µm, D 100 µm; Two-way Anova, \*\*\*p<0,001; n=Anzahl der analysierten Ausschnitte.

#### 4.6 Die Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen wird über EphrinA5/EphA4 Interaktionen beeinflusst

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei EphrinA5 um einen membrangebundenen Liganden, der mit verschiedenen Eph-Rezeptortyrosinkinasen interagieren kann. Neben allen Rezeptoren des A-Systems ist auch EphB2 ein potentieller Bindungspartner von EphrinA5 (Gale et al., 1996; Himanen et al., 2004). Unter all den möglichen Interaktionspartnern sollte deshalb der Effekt-vermittelnde Rezeptor identifiziert werden. Dazu wurde zunächst das Expressionsmuster aller potentiellen Bindungspartner mittels *in situ* Hybridisierung an E14,5 analysiert um zu ermitteln, welche Rezeptoren in den proliferativen Zonen gebildet werden (Abbildung 11).

Unter allen untersuchten Eph-Rezeptortyrosinkinasen zeigte lediglich EphA4 eine deutliche Expression in den transienten, proliferativen Zonen (Abbildung 11 E). Für EphA4 wurde bereits beschrieben, dass es die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen fördert (North et al., 2009). Somit ist der EphA4-Rezeptor ein vielversprechender Kandidat, der durch EphrinA5-Bindung die mitotische Aktivität kortikaler Vorläuferzellen beeinflussen könnte.



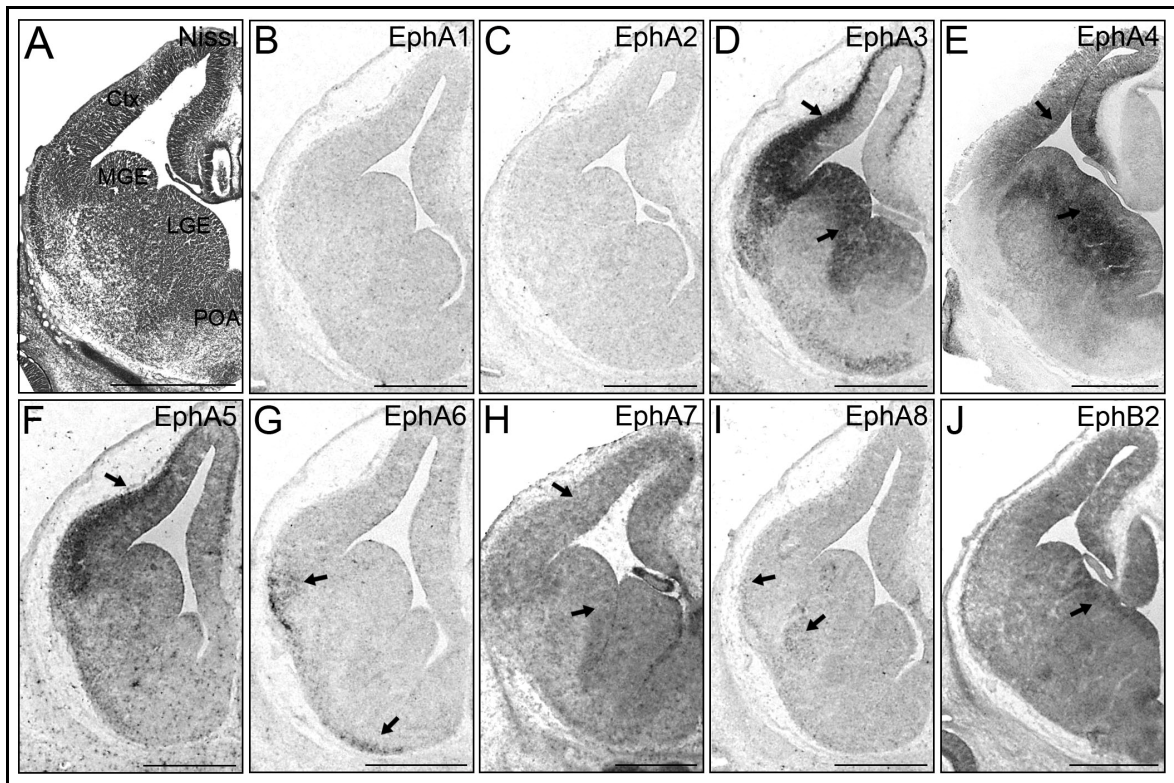


Abbildung 11: EphA4 wird in den transienten, proliferativen Zonen des embryonalen Kortex exprimiert. EphrinA5 kann an alle Rezeptoren des A-Systems, sowie an EphB2 binden. Die Nisslfärbung eines koronalen Gehirnschnittes an E14,5 veranschaulicht die verschiedenen embryonalen Domänen (A). EphA1 (B), EphA2 (C), EphA6 (G) und EphA8 (I) wurden an E14,5 nicht im embryonalen Kortex detektiert, während EphA7 (H) und EphB2 (J) eine schwache Expression über alle embryonalen Schichten zeigten. EphA3 (D) und EphA5 (F) wurden an E14,5 in der kortikalen Platte exprimiert und lediglich EphA4 (E) wies eine deutliche Expression in den transienten, proliferativen Zonen des embryonalen Kortex auf. Resultate aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten; Balken: 500 µm; Ctx=Kortex; LGE=Laterale ganglionische Eminenz; MGE=Mediale ganglionische Eminenz; POA=Präoptisches Areal.

Um zu verifizieren, ob es sich bei EphA4 um den Effekt-vermittelnde Rezeptor handelt, wurden die kortikalen Schichten adulter EphA4-knockout Mäuse adäquat zu den EphrinA5-defizienten Tieren hinsichtlich der radialen Ausdehnung untersucht. Falls die Interaktion zwischen EphA4 und EphrinA5 die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen reguliert, würde auch eine EphA4-Defizienz eine Fehlbildung der laminaren Architektur verursachen. Deshalb wurden Gehirnschnitte adulter EphA4-defizienter Mäuse angefertigt und mittels DAPI-Kernfärbung markiert, um eine Unterscheidung der kortikalen Schichten zu ermöglichen. Die Quantifizierung der laminaren Organisation in EphA4-knockout Mäusen ergab analog zu den Resultaten aus EphrinA5-defizienten Tieren eine persistente Verschiebung der kortikalen Schichten. Dieser Phänotyp war in den EphA4-defizienten Mäusen sogar noch stärker manifestiert als in vergleichbaren EphrinA5-knockout Tieren. Auch in EphA4-defizienten Mäusen konnte im Vergleich zum WT eine Expansion

der infragranulären Schichten 5 und 6, bei gleichzeitiger Reduktion der supragranulären Schichten 2/3 und 4 im somatosensorischen Kortex (Bregma=0; Interaural=3,8 mm) ermittelt werden (Abbildung 12). Dabei nahmen die unteren Schichten 5 und 6 in den EphA4 ko Tieren um 6,4 % zu, auf insgesamt 57,8 % ( $\pm 0,5$  %). Im Gegensatz dazu waren die supragranulären Schichten 2/3 und 4 EphA4-defizienter Mäuse auf insgesamt 34,2 % ( $\pm 0,5$  %) reduziert (WT n=16, EphA4 ko n=24; T-Test, \*\*\* p<0,001). Der vergleichbare Phänotyp EphrinA5-defizienter und EphA4-knockout Mäuse weist darauf hin, dass EphA4/EphrinA5-Interaktionen die Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen regulieren und dadurch die korrekte Ausbildung der kortikalen Zytoarchitektur beeinflussen.

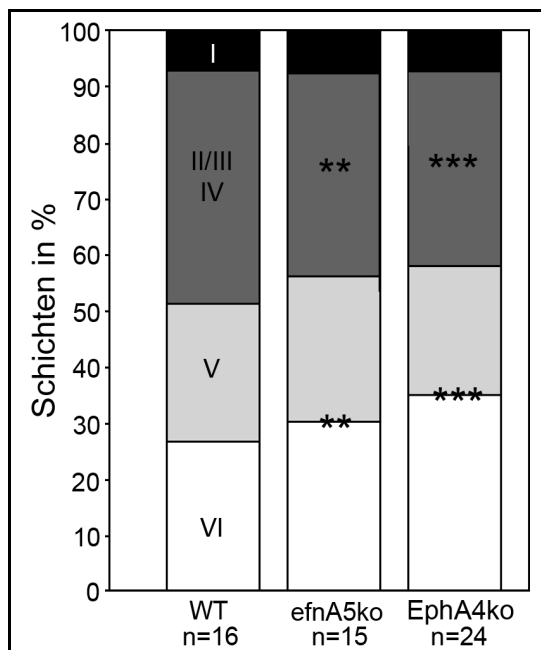


Abbildung 12: EphA4-Defizient verursacht eine persistente Verschiebung der adulten, kortikalen Schichten. Eine Quantifizierung der radialen Ausdehnung einzelner kortikaler Schichten im somatosensorischen Kortex (Bregma=0; Interaural=3,8 mm) EphA4-defizienter Mäuse an P37 deutete auf eine Verschiebung der laminaren Organisation hin, wie sie auch in EphrinA5-knockout Tieren detektiert wurde. Die Analyse ergab eine Expansion der infragranulären Schichten 5 und 6, bei einer gleichzeitigen Reduktion der supragranulären Schichten 2/3 und 4. Resultate aus 3 unabhängigen Experimenten; T-Test, \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,001 (MW $\pm$ SEM); n=Anzahl der analysierten Ausschnitte.

#### 4.7 EphA4 ist auf den basalen Fortsätzen radialer Gliazellen lokalisiert

*In situ* Hybridisierungen gegen EphA4-mRNA an E14,5 zeigten, dass der Rezeptor in den transienten, proliferativen Zonen des murinen Kortex exprimiert wird (Abbildung 13 A). Deshalb wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung in koronalen Gefrierschnitten an E14,5 gegen EphA4 und Nestin durchgeführt, einem Marker für neuronale Vorläuferzellen. Nestin-positive, radiale Gliazellen weisen morphologisch eine charakteristische polare Struktur auf. Sie besitzen einen langen radialen Fortsatz der sich durch den gesamten Kortex bis zur Pia spannt. Die immunhistochemische Markierung deutete darauf hin, dass der EphA4-Rezeptor in die Zellmembran um das Soma herum und entlang der radialen Fortsätze integriert ist (Abbildung 13 B). Diese Resultate sollten im Folgenden an dissoziierten, kortikalen Einzelzellen verifiziert werden.

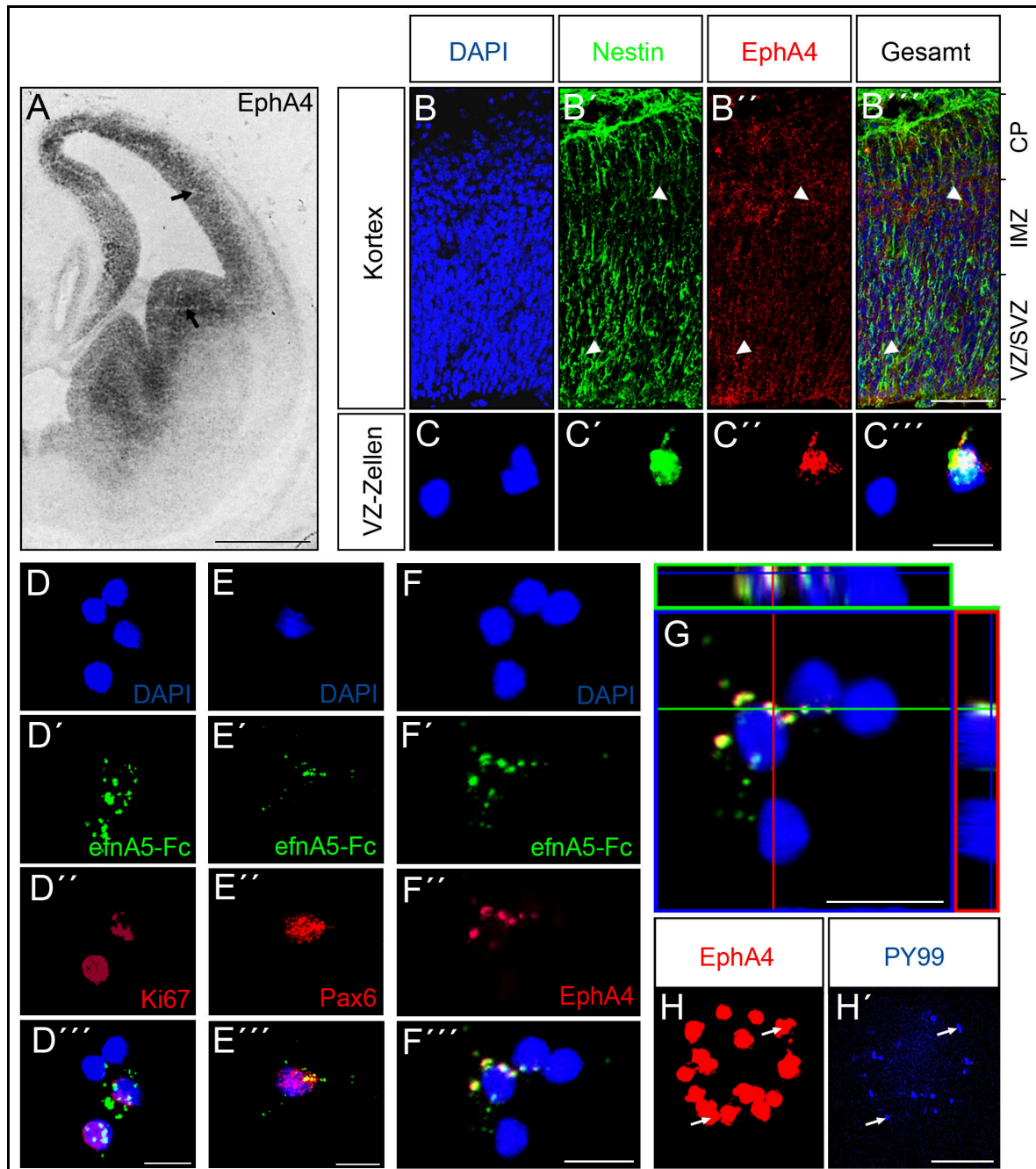


Abbildung 13: EphA4 wird von radialen Gliazellen exprimiert und ist in der Zellmembran entlang der glialen Fortsätze lokalisiert. Eine *in situ* Hybridisierung an E14,5 gegen EphA4 (A) zeigt, dass der Rezeptor in den transienten proliferativen Zonen des sich entwickelnden embryonalen Kortex exprimiert wird. Immunhistochemische Markierungen an E14,5 gegen EphA4 und Nestin an wildtypischen koronalen Gehirnschnitten (B) und dissoziierten Einzelzellen (C) zeigen eine Expression des Rezeptors durch radiale Gliazellen. Um zu überprüfen, ob rekombinantes EphrinA5-Fc an kortikale Vorläuferzellen bindet, wurden dissoziierte Einzelzellen von wildtypischen Embryonen an E14,5 isoliert und mit rekombinantem Alexa488-markiertem EphrinA5-Fc inkubiert. EphrinA5-Fc-Alexa488 bindet an Ki67-positive (D) und Pax6-reaktive (E) Vorläuferzellen. Die Überlagerung des EphrinA5-Alexa488-Signals mit einer EphA4-Markierung lässt darauf schließen, dass rekombinantes EphrinA5-Fc-Alexa488 an EphA4 bindet (F). Die orthographische Darstellung konnte dabei eine direkte Kolo-kalisation von Rezeptor und Ligand zeigen (G). Durch diese Interaktion wird der Rezeptor aktiviert, wie eine immunhistochemische Markierung gegen EphA4 (H) und PY99 veranschaulicht (H'). Resultate aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: A 500 µm, B 100 µm, C-G 10 µm, H 5 µm; CP=kortikale Platte, IMZ=Intermediärzone, VZ=Ventrikularzone, SVZ=Subventrikularzone.



Dazu wurde der Kortex von wildtypischen Embryonen an E14,5 isoliert, kortikale Einzelzellen isoliert und diese für 24 Stunden auf beschichteten Deckgläschen kultiviert. Nach der Fixation erfolgte ebenfalls eine Antikörpermarkierung gegen EphA4 und Nestin. Analog zu den Beobachtungen in den Gehirnschnitten, konnte eine Expression des EphA4-Rezeptors durch radiale Gliazellen detektiert werden (Abbildung 13 C). Die Quantifizierung deutet dabei auf eine vollständige Koexpression hin, da jede analysierte, Nestin-positive Vorläuferzelle (n=58) ein entsprechendes Signal des EphA4-Rezeptors aufwies. Jedoch konnte keine EphA4-Expression durch  $\beta$ III-Tubulin-reaktive, postmitotische Neurone detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit der *in situ* Hybridisierung und weisen darauf hin, dass EphA4 von kortikalen Vorläuferzellen exprimiert wird.

Um zu analysieren, ob rekombinantes EphrinA5 an den EphA4-Rezeptor bindet und um die EphrinA5-affinen Bindungsstellen auf zellulärer Ebene zu charakterisieren, wurden im Folgenden Bindungsexperimente an dissoziierten kortikalen Einzelzellen durchgeführt. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus Gewebe des somatosensorischen Kortex wildtypischer Embryonen an E14,5 hergestellt und auf beschichteten Deckgläschen kultiviert. Bevor die kortikalen Zellen nach 24 Stunden fixiert wurden, erfolgte eine Inkubation mit 5  $\mu$ g/ml des rekombinanten Liganden EphrinA5, der mit einem Alexa488-konjugierten Antikörper geclustert wurde. Anschließend wurden die kortikalen Einzelzellen mit verschiedenen Markern hinsichtlich ihrer Identität untersucht.

Zunächst sollte analysiert werden, ob EphrinA5 an kortikale Vorläufer bindet, die EphA4 exprimieren. Dazu wurden die Zellen gegen den Transkriptionsfaktor Pax6 gefärbt, der exklusiv in apikalen Vorläuferzellen exprimiert wird. Die ermittelten Daten weisen darauf hin, dass rekombinantes EphrinA5-Fc an Pax6-reaktive radiale Gliazellen bindet (Abbildung 13 E), für die eine EphA4-Expression bereits in vorherigen Experimenten detektiert wurde. Weiterhin erfolgte eine Antikörpermarkierung gegen EphA4 (Abbildung 13 F), wodurch eine Kolo-kalisation des Alexa488-konjugierten, rekombinanten EphrinA5 und dem Rezeptor ermittelt wurde (Abbildung 13 G). Eine zusätzliche Färbung gegen Phosphotyrosin (PY99) zeigt, dass der EphA4-Rezeptor durch die Interaktion mit EphrinA5 aktiviert wird (Abbildung 13 H). Fc-Kontrollprotein, welches ebenfalls mit dem Alexa488-konjugierten Antikörper geclustert wurde, bindet nicht an die dissoziierten Einzelzellen, was die Spezifität der detektierten Interaktionen verdeutlicht (Daten nicht gezeigt). Die Bindungsstudien an dissoziierten kortikalen Einzelzellen stützen die Hypothese, dass EphrinA5 mit dem affinen Bindungspartner EphA4 interagiert, der entlang der radialen Fortsätze von apikalen Vorläuferzellen exprimiert wird. Die Markierung gegen Phosphotyrosin deutet an, dass der EphA4-Rezeptor durch diese Interaktion aktiviert wird, was wiederum die Proliferation und Identität der kortikalen Vorläuferzelle beeinflussen kann. Diese Ergebnisse sind

übereinstimmend mit den vergleichbaren Phänotypen in EphA4- und EphrinA5-knockout Mäusen und lassen auf eine Relevanz dieser Liganden/Rezeptor-Bindung für die Entwicklung der kortikalen Schichten schließen.

#### **4.8 EphrinA5 konnte weder in proliferativen, noch in postmitotischen kortikalen Zellen detektiert werden**

Mittels RT-PCR konnte EphrinA5 bereits früh während der Neurogenese an E13,5 in embryonalem kortikalem Gewebe detektiert werden (Abbildung 14 C). Jedoch zeigten *in situ* Hybridisierungen gegen EphrinA5 an E13,5 (Abbildung 14 A) und E14,5 (Abbildung 14 B) kein Signal im sich entwickelnden Kortex. Somit ergab sich die Frage, wo der Ligand exprimiert wird und wie dieser mit seinem affinen Rezeptor EphA4 in Kontakt kommt. Mit Hilfe von Transkriptionsanalysen an kortikalen Einzelzellen sollte die Identität und Herkunft EphrinA5-exprimierender Zellen aufgeklärt werden. Diese Methode ist zum einen sensitiver als *in situ* Hybridisierung und hat andererseits den Vorteil, dass die isolierten Zellen mit verschiedenen sequenzspezifischen Primern hinsichtlich ihres Expressionsprofils klassifiziert werden können. Dazu wurden zunächst dissoziierte Zellsuspensionen aus Gewebe der kortikalen Platte und proliferativen Zonen wildtypischer Embryonen an E16,5 hergestellt und einzelne Zellen manuell isoliert. Die mRNA dieser Zellen wurde anschließend durch reverse Transkription in repräsentationsgetreue cDNA-Bibliotheken umgeschrieben und durch RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern klassifiziert (Abbildung 14 D, E). Um die Qualität sicher zu stellen, wurden nur solche Zellen für weitere Analysen verwendet, die eine stabile Expression des konstitutiv exprimierten Gens  $\beta$ Aktin aufwiesen. Die untersuchten Zellen wurden als mitotisch aktiv klassifiziert, wenn sie Ki67 exprimierten, während postmitotische Projektionsneurone positiv für den Marker HuD (Fujiwara et al., 2008; Gauthier-Fisher et al., 2009) sind.

Von insgesamt 71 analysierten kortikalen Einzelzellen wurden 12 eindeutig als Ki67-positive Vorläufer identifiziert. Während davon 10 Zellen Transkripte des Rezeptors EphA4 aufwiesen, konnte kein EphrinA5 in diesen mitotisch aktiven Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 14 D). Weiterhin wurden 17 Einzelzellen als postmitotische Neurone identifiziert. Jedoch konnte auch in keiner dieser HuD-positiven cDNA-Bibliotheken EphrinA5 detektiert werden (Abbildung 14 E). Dagegen konnte EphrinA5 mit demselben Verfahren in Einzelzellen aus der POA detektiert werden, für die eine Expression des Signalmoleküls bereits beschrieben wurde (Zimmer et al., 2008).

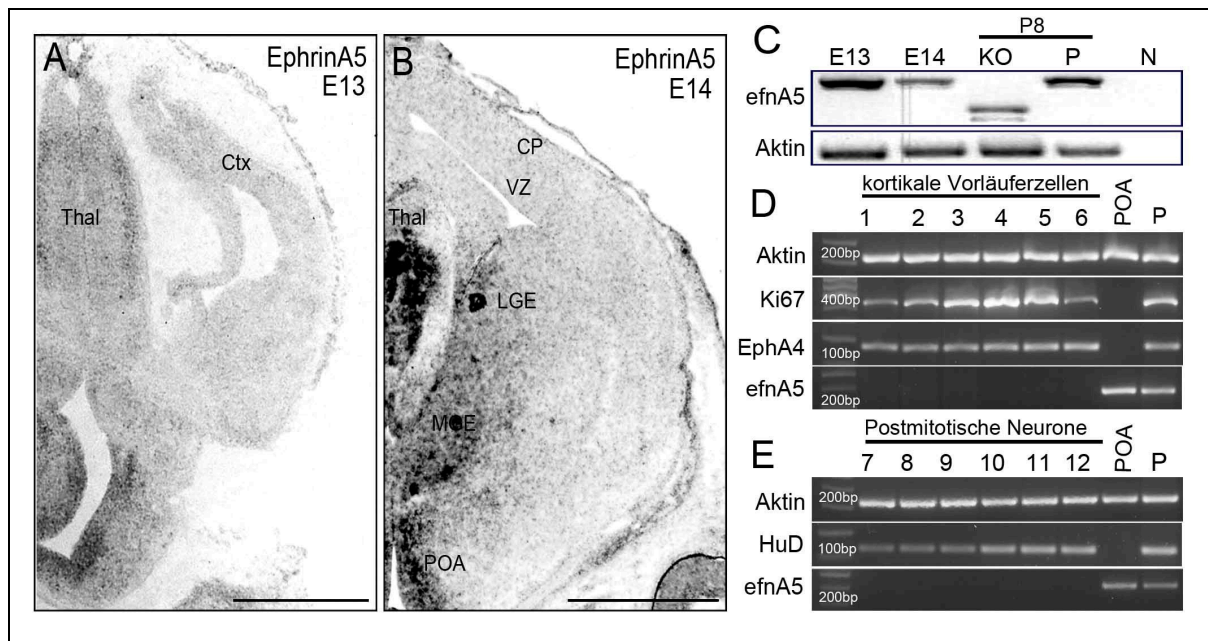


Abbildung 14: EphrinA5 wird weder von proliferativen, noch von postmitotischen kortikalen Zellen exprimiert. Durch RT-PCR wurde EphrinA5 bereits in kortikalen Gewebe an E13,5 nachgewiesen (C). Mittels *in situ* Hybridisierungen gegen EphrinA5 an E13,5 (A) und E14,5 (B) konnte jedoch kein Signal im sich entwickelnden Neokortex detektiert werden. Die mRNA ließ sich aber im basalen Telenzephalon und im embryonalen Thalamus nachweisen. Durch Transkriptomanalysen einzelner kortikaler Zellen wurde untersucht, welche neuronalen Zellen die Signalmoleküle EphrinA5 und EphA4 exprimieren. Kortikale Vorläuferzellen zeichneten sich durch die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 aus. In diesen mitotisch aktiven Zellen konnte eine Expression von EphA4 ermittelt werden, jedoch wurden keine EphrinA5-Transkripte detektiert (D). Postmitotische Neurone wurden durch die exklusive Expression des Markers HuD identifiziert. Allerdings konnte durch RT-PCR keine EphrinA5-Expression in diesen postmitotischen Nervenzellen nachgewiesen werden (E). Im Gegensatz dazu konnte EphrinA5 in Einzelzellen aus der POA detektiert werden (D, E). Resultate aus 3 Experimenten; Balken: 500 µm; Ctx=Kortex, VZ=Ventrikularzone, CP=kortikale Platte, Thal=Thalamus.

Die Resultate der RT-PCR an dissoziierten Einzelzellen konnten die EphA4-Expression durch kortikale Vorläuferzellen verifizieren. Jedoch wurde kein EphrinA5 in mitotisch aktiven kortikalen Zellen detektiert. Eine parakrine Rezeptoraktivierung durch benachbarte Vorläuferzellen scheint daher unwahrscheinlich. Weiterhin deuten die Daten an, dass EphrinA5 nicht von postmitotischen Projektionsneuronen gebildet wird. Daher scheint die Rezeptoraktivierung über einen *feedback* Mechanismus von der kortikalen Platte undenkbar.

#### 4.9 Die proliferativen Effekte in EphrinA5-defizienten Mäusen werden nicht durch Unterschiede in der Invasion kortikaler Interneurone verursacht

Als nächstes wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass migrierende Interneurone aus dem basalen Telenzephalon den A-Liganden in den Kortex importieren. Wie in der *in situ* Hybridisierung ersichtlich ist, wird EphrinA5 in den ganglionischen Eminenzen im basalen Telenzephalon exprimiert (Abbildung 14 B). Für EphrinA5 wurde bereits beschrieben, dass es die

Migration GABAerger Interneurone reguliert, indem es sie davon abhält in Nicht-Zielgebiete einzuwandern (Zimmer et al., 2008). Somit ist es denkbar, dass der Effekt auf die Proliferation in EphrinA5-defizienten Mäusen durch ein verspätetes Einwandern kortikaler Interneurone verursacht wird. Hinzu kommt, dass der Neurotransmitter GABA selbst die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen steuert (Haydar et al., 2000; Wang and Kriegstein, 2009). Das bedeutet, dass einmigrierende inhibitorische Interneurone die Proliferation kortikaler Vorläufer beeinflussen könnten. Deshalb ist es vorstellbar, dass die veränderte Proliferation in EphrinA5-defizienten Mäusen ein indirekter Effekt fehlgeleiteter Interneurone darstellt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden mit Hilfe immunhistochemischer Markierungen gegen Calbindin die einwandernden Interneurone an unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht (Abbildung 15). Calbindin ist ein etablierter Marker für unreife Interneurone (Anderson et al., 1997; Faux et al., 2010; Polleux et al., 2002) und dient daher als Hinweis, wie weit dieser Zelltyp bereits in den sich entwickelnden Kortex einmigriert ist. Um auf die Proliferation zu wirken, müssen die Interneurone im dorsolateralen Kortex präsent sein. Da in der vorliegenden Arbeit bereits zur frühen Neurogenese an E13,5 eine veränderte Proliferation in den EphrinA5-knockout Mäusen ermittelt wurde, erfolgte die Analyse der Interneurone zu diesem Entwicklungszeitpunkt. Außerdem wurde zur späten Neurogenese an E16,5 analysiert, ob Unterschiede zwischen EphrinA5-defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtypen hinsichtlich der Interneuroneninvasion in den zerebralen Kortex auftreten. Ermittelt wurde der Migrationsindex, der sich aus der Migrationsdistanz der Interneurone im Kortex im Verhältnis zur gesamten Kortextlänge berechnet.

Die Immunhistochemische Markierung gegen Calbindin an E13,5 (Abbildung 15 A, B) weist darauf hin, dass die ersten kortikalen Interneurone gerade erst die Grenze zwischen Pallium und Subpallium passiert haben und beginnen, in das dorsale Telenzephalon einzuwandern. Die Quantifizierung der Migrationsdistanz (Abbildung 15 C) verdeutlicht, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen EphrinA5-defizienten Versuchstieren und gleichalten Wildtypen ermittelt wurden. Die Migrationsdistanz, normalisiert auf die gesamte Kortextlänge, ergab einen Quotienten von  $0,06 (\pm 0,02)$  im EphrinA5-knockout und  $0,1 (\pm 0,04)$  in wildtypischen Kontrolltieren (WT n=8, KO n=10; T-Test,  $p > 0,05$ ). Diese Daten weisen darauf hin, dass zur frühen Neurogenese an E13,5, wenn in EphrinA5-defizienten Mäusen die ersten proliferativen Veränderungen detektiert werden, die kortikalen Interneurone noch nicht den dorsolateralen Kortex erreicht haben.

Auch zur späteren Neurogenese an E16,5 konnten keine Unterschiede in der Anzahl und Verteilung der kortikalen Interneurone in WT und KO festgestellt werden (Abbildung 15 D-E). Im WT wurde eine auf die Kortextlänge normalisierte Migrationsdistanz von  $0,71 (\pm 0,08)$  ermittelt und ein Quotient von  $0,7 (\pm 0,04)$  im KO (WT  $n=11$ , KO  $n=12$ ; T-Test,  $p>0,05$ ; Abbildung 15 F). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Veränderungen der Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen nicht durch die Invasion EphrinA5-exprimierender Interneurone verursacht werden.

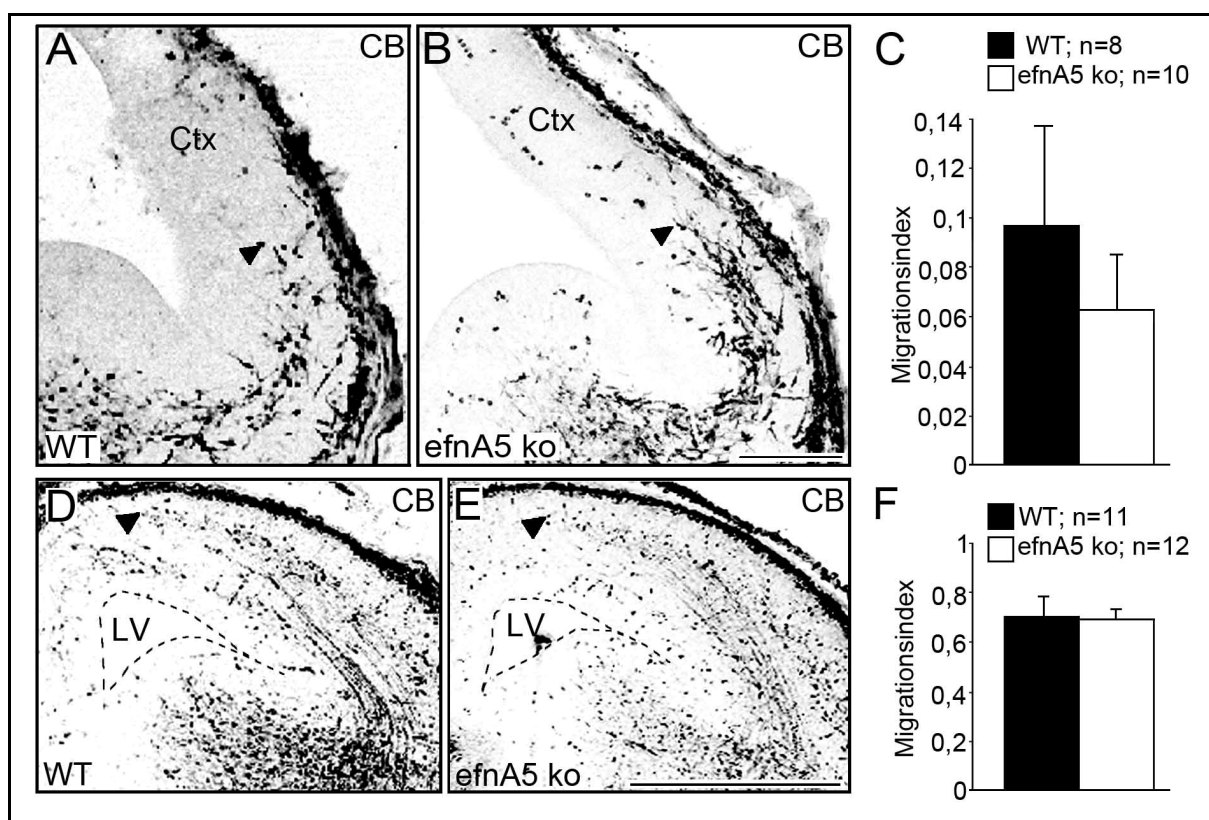


Abbildung 15: Es gibt keine Unterschiede in der Invasion kortikaler Interneurone in den Neokortex von EphrinA5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren. Immunhistochemische Markierungen gegen den Marker Calbindin, der spezifisch in unreifen Interneuronen exprimiert wird, visualisieren in den Kortex einwandernde inhibitorische Interneurone. Zur frühen Neurogenese an E13,5 konnten in EphrinA5-defizienten Mäusen bereits die ersten proliferativen Unterschiede ermittelt werden. Die immunhistochemische Markierung gegen Calbindin zeigt, dass die kortikalen Interneurone zu diesem Entwicklungszeitpunkt erst die palliale-subpalliale Grenze erreicht haben (A WT, B KO). Die Quantifizierung an E13,5 ergab keine signifikanten Unterschiede in der Migrationsrate in den Kortex invadierender Interneurone (C). Auch zur späteren Kortexentwicklung an E16,5 wurden keine Unterschiede in der Migrationsdistanz kortikaler Interneurone zwischen WT (D) und KO (E) ermittelt (F). Resultate aus 2 Experimenten; n= Anzahl der analysierten Ausschnitte; Balken: B 200  $\mu$ m, E 500  $\mu$ m; Ctx= Kortex, LV=lateraler Ventrikel.

#### **4.10 Thalamische Afferenzen importieren extrakortikales EphrinA5 in den sich entwickelnden Neokortex**

Die bisherige Suche nach dem Signalmolekül EphrinA5 deutet darauf hin, dass die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen zwar abhängig von EphrinA5 ist, jedoch konnte der Ligand weder in proliferativen, noch in postmitotischen kortikale Zellen detektiert werden. Auch migrierende, GABAerge Interneurone scheinen nicht die proliferativen Unterschiede in EphrinA5-defizienten Mäusen zu verursachen. Deshalb fokussierten sich die Untersuchungen im Folgenden auf ein extrakortikales Gebiet, in dem bereits während der frühen Neurogenese an E13,5 eine EphrinA5-Expression detektiert wurde. Wie die *in situ* Hybridisierung verdeutlicht, wurde der Ligand bereits an E13,5 in der Mantelzone des embryonalen Thalamus detektiert (Abbildung 16 D). Aus diesem Grund wurde im Folgenden analysiert, ob einwachsende thalamokortikale Fasern den Liganden in den Neokortex importieren und dadurch die mitotische Aktivität kortikaler Vorläufer beeinflussen.

Die ersten thalamischen Axone erreichen den Kortex bereit an E13 und beginnen ab E14 in die Subplatte einzuwachsen (Auladell et al., 2000). Um den zeitlichen Verlauf der einwachsenden thalamokortikalen Projektionen zu verifizieren wurden vergleichende immunhistochemische Markierungen unterschiedlicher Entwicklungszeitpunkte an Wildtyptieren durchgeführt. Dabei wurde ein Antikörper gegen das Zelladhäsionsmolekül L1 verwendet, welches im Thalamus exprimiert wird und ebenfalls entlang der thalamokortikalen Axone lokalisiert ist (Demyanenko et al., 2011). Bereits an E13,5 konnten thalamokortikale Fasern in der Mantelzone des embryonalen Thalamus ermittelt werden (Abbildung 16 E). In dieser Zone wurde auch eine EphrinA5-Expression detektiert (Abbildung 16 D). Außerdem wurden an E13,5 bereits Pionierneurone an der pallialen-subpallialen Grenze visualisiert. Dies deutet darauf hin, dass die ersten thalamokortikalen Fasern bereits den Kortex erreicht haben. Zu diesem Zeitpunkt wurden im dorsolateralen Kortex EphrinA5-defizienter Mäuse die ersten proliferativen Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet. An E14,5 (Abbildung 16 B) wurde ein deutliches faserartiges Signal in der IMZ ermittelt, welches an E16,5 (Abbildung 16 C) die komplette IMZ bis hin zum medialen Kortex durchzog. Somit scheint die thalamokortikale Projektion dem zeitlichen Verlauf der Neurogenese zu folgen. Erste Pionieraxone scheinen bereits während der Bildung der tiefen Schichten an E13,5 im dorsolateralen Kortex vorhanden zu sein und wenn die Mehrheit der kortikalen Projektionsneurone generiert wird, wurde bereits eine stabile thalamokortikale Projektion beobachtet.



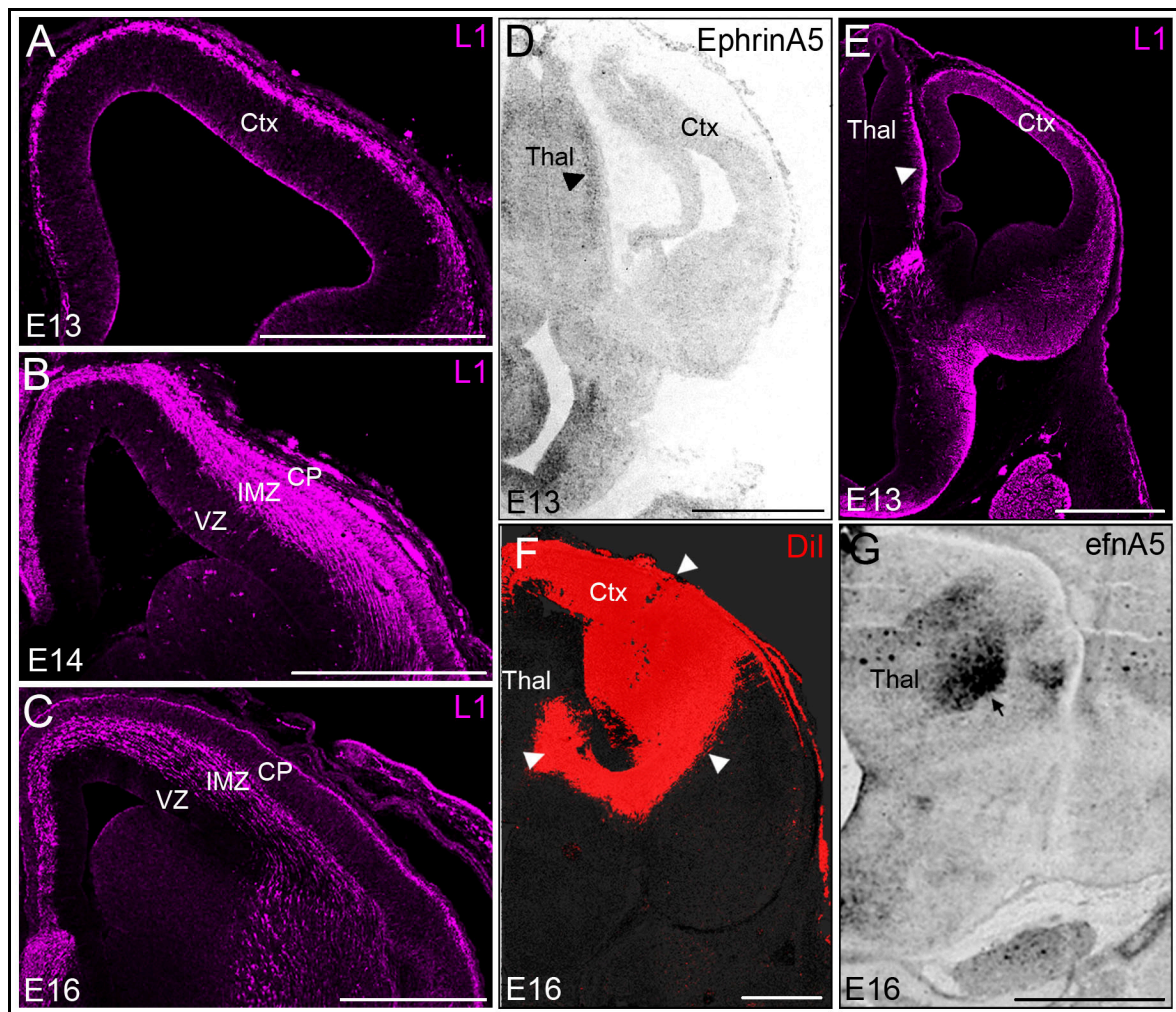


Abbildung 16: An E13,5 erreichen die ersten Pionieraxone aus dem Thalamus, wo auch EphrinA5 exprimiert wird, den sich entwickelnden Kortex. Das Zelladhäsionsprotein L1 visualisiert die thalamokortikale Projektion. An E13,5 ist ein Signal von der Mantelzone des sich entwickelnden Thalamus (E), bis hin zur pallialen-subpallialen Grenze sichtbar (A). In der Mantelzone des embryonalen Thalamus wird an E13,5 auch das Signalmolekül EphrinA5 exprimiert (D). An E14,5 (B) und E16,5 (C) konnte bereits eine stabile thalamokortikale Projektion ermittelt werden. *Tracing*-Experimente an E16,5 mit dem fluoreszierenden Farbstoff Dil visualisieren Fasern im Kortex, basalen Telenzephalon und im ventrobasalen Kernkomplex des embryonalen Thalamus (F), der bereits bekannt ist, den somatosensorischen Kortex zu innervieren. Eine *in situ* Hybridisierung gegen EphrinA5 an E16,5 weist darauf hin, dass auch der Ligand im thalamischen ventrobasalen Kernkomplex exprimiert wird. Resultate aus mindestens 2 Experimenten; Balken: 500 µm; Ctx=Kortex, Thal=Thalamus, VZ=Ventrikularzone, IMZ=Intermediärzone, CP=Kortikale Platte.

Als Nächstes sollte ein *Tracing* Experiment mit dem Farbstoff Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate) die innervierenden thalamokortikalen Fasern visualisieren. Das fluoreszierende Dil kann im fixierten Gewebe sowohl als retrograder, als auch als anterograder Marker eingesetzt werden (Godement et al., 1987). Der Farbstoff dringt in die angrenzenden Zellen, verteilt sich durch Diffusion über die Lipidmembran und visualisiert dadurch die gesamte Morphologie einer Zelle. Dazu wurde ein Kristall Dil in den dorsolateralen Kortex fixierter Gehirne an E16,5 platziert und diese für einen Monat bei 37 °C inkubiert. Danach wurden

Gefrierschnitte angefertigt und mikroskopisch analysiert. Der fluoreszierende Farbstoff visualisierte Fasern im Kortex, basalen Telenzephalon und Thalamus (Abbildung 16 F). Das Signal akkumulierte im thalamischen ventrobasalen Kernkomplex, der bereits beschrieben ist den somatosensorischen Kortex zu innervieren (Uziel et al., 2006). Eine *in situ* Hybridisierung an E16,5 zeigte, dass in diesem thalamischen Kernkomplex auch das Signalmolekül EphrinA5 exprimiert wird (Abbildung 16 G). Die Resultate weisen darauf hin, dass Zellen des thalamischen ventrobasalen Kerns das Signalmolekül EphrinA5 exprimieren und über die thalamokortikale Innervation in den Kortex importiert wird.

Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass thalamische Axone die Proliferation muriner, kortikaler Vorläuferzellen regulieren (Dehay et al., 2001). So wurde auch für das Oberflächenmolekül L1 beschrieben, dass es die Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen fördert (Dihne et al., 2003). Da EphrinA5 ebenfalls die Wegfindung von Axonen reguliert ist es denkbar, dass die thalamischen Fasern EphrinA5 defizienter Mäuse verspätet in den Kortex einwachsen und dadurch indirekt die Proliferation beeinflusst wird. Um einen möglichen indirekten Effekt aufzuklären, wurde das Wachstum thalamischer Fasern *in vitro* untersucht. Dazu wurde der embryonale Thalamus von EphrinA5-knockout Mäusen und vergleichbaren Wildtypen an E14,5 isoliert und Explantate hergestellt, die für zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert wurden (Abbildung 17 A). Anschließend wurde ermittelt, wie weit die Axone ausgewachsen waren. Analysiert wurde der Quotient aus der Fläche der ausgewachsenen Fasern und der Größe des ursprünglichen Explantates. Die Quantifizierung der Wachstumsrate (Abbildung 17 B) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Thalamusexplantaten aus EphrinA5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren. Der ermittelte Quotient betrug für wildtypische Thalamusexplantate  $3,3 (\pm 0,2)$  und  $3,6 (\pm 0,2)$  für den Knockout (WT n=58, KO n=27; T-Test,  $p>0,05$ ; Abbildung 17 C). Die vergleichbare Wachstumsrate spricht damit gegen einen indirekten Effekt der thalamokortikalen Projektion durch Unterschiede beim Einwachsen.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob thalamische Explantate EphrinA-Liganden exprimieren. Aus Ermangelung eines spezifischen Antikörpers gegen EphrinA5, der in der Immunhistochemie funktioniert, wurden Bindungsexperimente mit rekombinantem EphA3-Fc durchgeführt. Dieser synthetische Rezeptor bietet den Vorteil gegenüber rekombinantem EphA4, dass er lediglich an Liganden des EphrinA-Systems bindet. EphA4 kann zusätzlich mit EphrinB2 und EphrinB3 interagieren. Der rekombinante EphA3-Rezeptor wurde mit einem Alexa488-konjugierten Antikörper geclustert und anschließend ausgewachsene Thalamusexplantate (2div) mit dem agglomierten Rezeptor inkubiert. Vor der Fixation wurden die Explantate mehrmals gewaschen, um unspezifische Signale durch ungebundenes EphA3-Fc Alexa488 zu vermeiden.



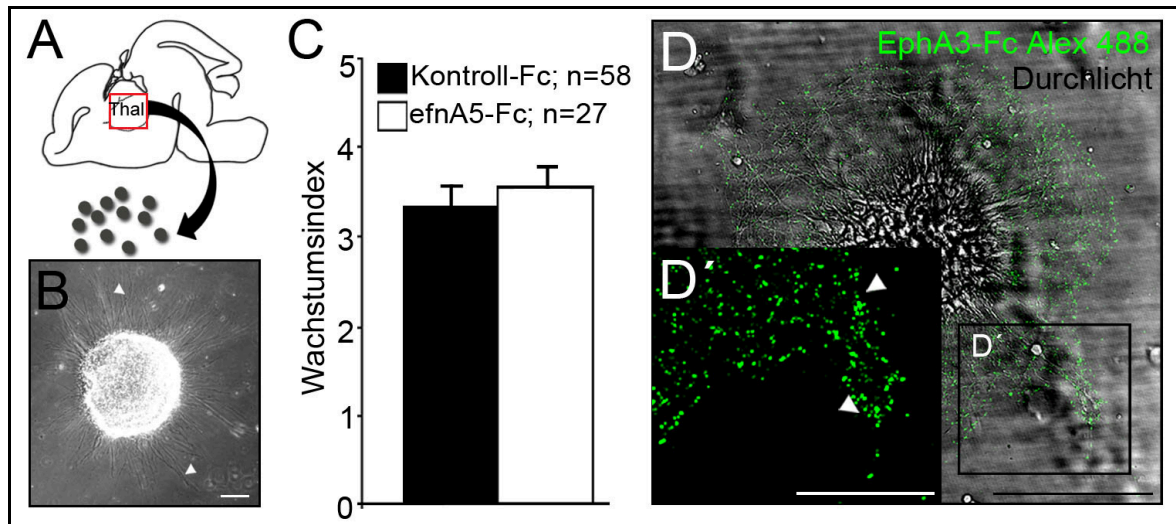


Abbildung 17: EphrinA-Liganden sind entlang thalamischer Axone lokalisiert. Für die Herstellung der Explantate wurde der embryonale Thalamus an E14,5 isoliert (A), manuell zerhackt und 2 Tage auf beschichteten Deckgläsern kultiviert (B). Um zu untersuchen, ob thalamische Explantate von WT und KO unterschiedlich auswachsen, wurde der Wachstumsindex der Explantate bestimmt (C). Dieser berechnete sich aus dem Quotienten der Fläche der ausgewachsenen Axone, normalisiert auf die Größe des ursprünglichen Explantats. Es konnte kein Unterschied in der Wachstumsrate von thalamischen Explantaten aus WT und KO ermittelt werden. Weiter wurde überprüft, ob die ausgewachsenen Axone EphrinA-Liganden aufweisen. Dazu wurden die thalamischen Explantate mit rekombinantem EphA3-Fc-Alexa488 inkubiert. 76,2 % ( $\pm 5,2$  %) der analysierten Explantate wiesen affine Bindungsstellen für den rekombinanten Rezeptor auf, die entlang der Axone lokalisiert waren (D). Resultate aus mindestens 2 Experimenten; n=Anzahl der analysierten Explantate; Balken: 500 µm; Ctx= Kortex, Thal=Thalamus, VZ=Ventrikularzone, IMZ=Intermediärzone, CP=Kortikale Platte.

Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals ergab, dass 76,2 % ( $\pm 5,2$  %) der analysierten Explantate (n=21) eine Bindung von rekombinantem EphA3-Fc Alexa488 aufwiesen. Dies lässt schlussfolgern, dass der embryonale Thalamus EphrinA-Liganden exprimiert und steht im Einklang mit der durchgeführten *in situ* Hybridisierung gegen EphrinA5. Das punktuelle Fluoreszenzsignal wurde entlang der ausgewachsenen thalamischen Axone detektiert (Abbildung 17 D), was darauf hindeutet, dass die A-Liganden in der Zellmembran der Fasern lokalisiert sind.

Kürzlich wurde für verschiedene axonale Proteine beschrieben, dass die mRNA in die Axone transportiert werden kann, um dort eine schnelle Expression zu gewährleisten und rasch auf Umwelteinflüsse reagieren zu können (Jung et al., 2012). In diesem Zusammenhang wurde auch für Ephrine diese axonale Transkription beschrieben. Deshalb sollte untersucht werden, ob EphrinA5-mRNA in thalamischen Axonen vorhanden ist. Dazu wurden die thalamischen Explantate zunächst mit dem Farbstoff Syto14® inkubiert. Dieser fluoreszente Marker interkaliert in Nukleinsäuren lebender Zellen, jedoch ist die Signalintensität um ein sechsfaches stärker, wenn es mit RNA interagiert (Knowles et al., 1996). Thalamische Explantate (E14,5) wurden für zwei Tage

kultiviert und vor dem Fixieren 1 h mit 5  $\mu$ M Syto14<sup>®</sup> inkubiert. Durch diese Methode konnten distinkte RNA-Granula entlang der thalamischen Axone visualisiert werden (Abbildung 18 A).

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob sich auch EphrinA5-mRNA in den Axonen von thalamischen Explantaten nachweisen lässt. Dazu wurden wieder Explantate aus wildtypischen Embryonen an E14,5 hergestellt und für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden manuell unter visueller Kontrolle die Axone von ausgewachsenen thalamischen Explantaten gesammelt (Abbildung 18 B), wobei darauf geachtet wurde, keine Kontamination durch Zellkörper zu erhalten. Anschließend wurde die RNA aufgereinigt und nach der cDNA-Synthese dienten spezifische Primer zum Nachweis der axonalen Transkripte. Da auch für das konstitutiv exprimierte Gen  $\beta$ Aktin solch ein axonaler Transport beschrieben wurde (Jung et al., 2012), diente dies als Positivkontrolle. Nur solche axonalen cDNA-Bibliotheken wurden zur weiteren Klassifizierung verwendet, die eine stabile Expression des konstitutiv aktiven Gens  $\beta$ Aktin aufwiesen.

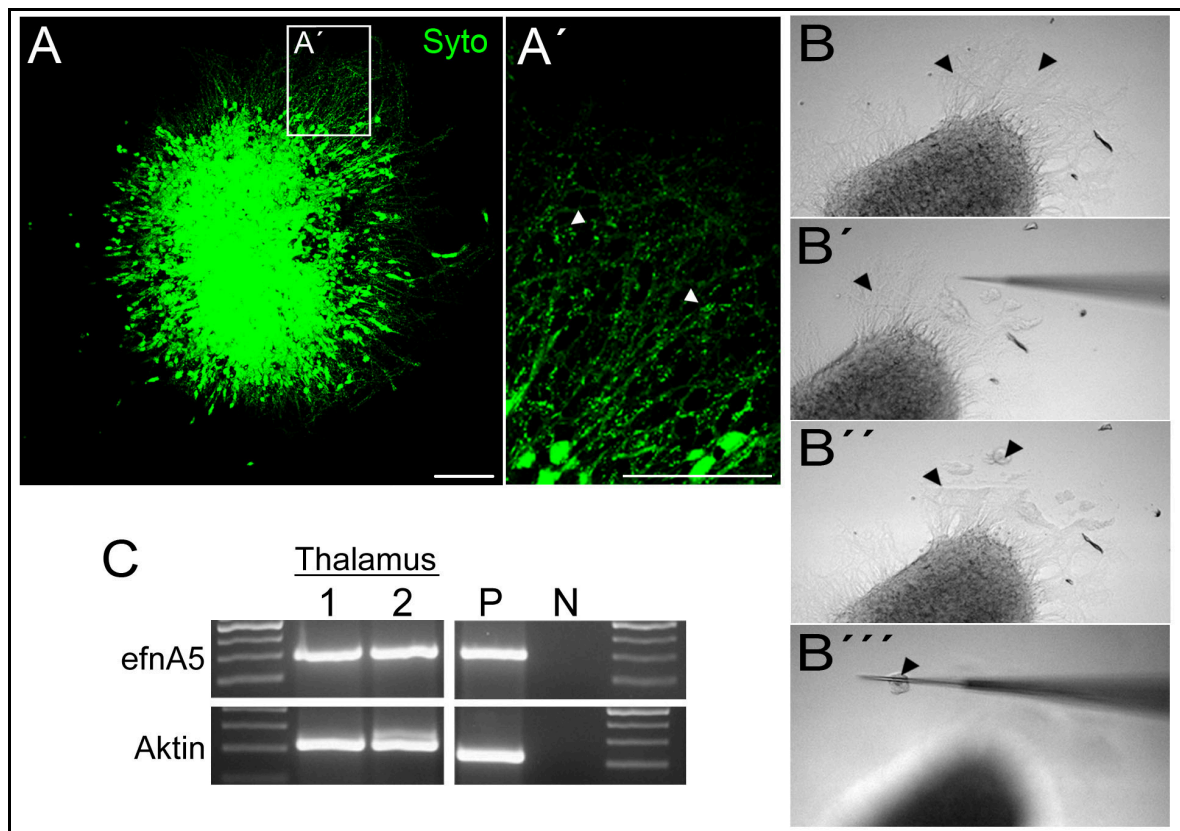


Abbildung 18: Thalamische Axone weisen EphrinA5-mRNA auf. Der Farbstoff Syto14<sup>®</sup> markiert Nukleinsäuren lebender Zellen (A). Die Markierung zeigt, dass in thalamischen Axonen RNA-Granula lokalisiert ist (Pfeil). Unter visueller Kontrolle wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators thalamische Axone manuell isoliert (B). Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Zellkerne mit aufgenommen wurden. Aus den gesammelten Axonen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In insgesamt 2 von 16 cDNA-Bibliotheken wurden EphrinA5-Transkripte detektiert (C). Resultate aus 3 Experimenten; n=Anzahl der analysierten cDNA-Bibliotheken; Balken: A 100  $\mu$ m, A' 50  $\mu$ m.

Die RT-PCR mit den axonalen Proben (Abbildung 18 C) zeigt, dass tatsächlich EphrinA5-Transkripte (n=2) in den analysierten, axonalen cDNA-Bibliotheken (n=16) nachgewiesen werden konnten. Da lediglich ein kleiner Bereich des embryonalen Thalamus EphrinA5 exprimiert, sind auch nur wenige der angefertigten Explantate positiv. Die Resultate deuten darauf hin, dass EphrinA5 von thalamischen Axonen exprimiert wird. Ein Import des Signalmoleküls in den sich entwickelnden Neokortex durch die thalamokortikale Innervation ist somit denkbar.

#### **4.11 Ektopisches EphrinA5-Fc in der kortikalen Platte und Intermediärzone beeinflusst die Identität der kortikalen Vorläuferzellen**

Wenn EphA4 von radialen Gliazellen exprimiert wird und durch die Lokalisation auf den Fortsätzen im gesamten Kortex vorhanden ist, sollte es für potentielle Interaktionspartner in allen embryonalen Schichten erreichbar sein. Um die Präsenz von möglichen Interaktionsstellen des Liganden EphrinA5 im embryonalen Kortex zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit rekombinantem EphrinA5-Fc in embryonalen, organotypischen Schnittkulturen durchgeführt. Dazu wurden lebende Gehirnschnitte von wildtypischen Embryonen an E14,5 angefertigt und mit 5 µg/ml rekombinantem EphrinA5-Fc inkubiert, welches zuvor mit einem Alexa488-konjugiertem Antikörper geclustert wurde. War eine entsprechende EphrinA5-affine Bindungsstelle in den Schnittkulturen vorhanden, wurde der rekombinante Ligand an dieser Stelle gebunden. Während ungebundene Liganden nach der Inkubation herunter gewaschen wurden, verblieb immobilisiertes EphrinA5-Fc Alexa488 auf den Schnitten und konnte nachfolgend mikroskopisch detektiert werden. Der rekombinante Ligand wurde im gesamten Kortex nachgewiesen, mit einer Akkumulation im Bereich der VZ und CP/IMZ (Abbildung 19 A). Diese Bindungsstudie deutet darauf hin, dass EphrinA5 im gesamten Kortex an affine Interaktionspartner binden kann und steht somit im Einklang mit der zuvor dargestellten Proteinverteilung des EphA4 Rezeptors.

Die mögliche Regulation der Proliferation durch eine EphA4/EphrinA5-Interaktion an den glialen Fortsätzen sollte nun anhand eines eleganten *in vitro* Versuchs funktionell analysiert werden. Dazu wurden lebende Schnittkulturen von EphrinA5-knockout Gehirnen an E14,5 angefertigt, bei denen im Folgenden entweder EphrinA5-Fc, oder Kontroll-Fc beschichtete Agarosekügelchen in die CP/IMZ platziert wurden (Abbildung 19 B). Dabei sollte untersucht werden, ob eine ektopische EphrinA5-Exposition in den basalen Zonen des embryonalen Kortex der knockout-Tiere eine erhöhte Produktion basaler Vorläuferzellen auslöst. Somit stellt auch dieser funktionelle Assay einen komplementären Ansatz zu der *loss of function* Mausmutante dar.

Da in vorangegangenen Experimenten bereits ermittelt wurde, dass EphrinA5-defiziente Mäuse eine verringerte Anzahl Tbr2-positiver, basaler Vorläuferzellen aufweisen, wurde im Bereich unter den Agarosekügelchen die Zellzahlen Tbr2-reaktiver Vorläufer quantifiziert (Abbildung 19 C).

Unter Beachtung des transversalen Entwicklungsgradienten (Bayer and Altman, 1991), wurde der Bereich unter den Agarosekugeln ausgezählt und auf gleichgroße laterale und mediale Areale normalisiert. Falls EphA4/EphrinA5-Interaktionen die Generierung basaler Vorläuferzellen fördert, sollten unter den EphrinA5-Fc beschichteten Kugeln mehr Intermediärzellen vorhanden sein als unter den Kontrollkugeln. Und tatsächlich fanden sich tendentiell mehr basale Intermediärzellen unterhalb des ektopischen EphrinA5-Fc (Abbildung 19 D). Im Vergleich zu den Kontrollen waren unter den EphrinA5-Fc beschichteten Agarosekugeln 19,93 % mehr Tbr2-reaktive, basale Intermediärzellen vorhanden (Kontrolle n=4, efnA5-Fc n=8; T-Test,  $p=0,06$ ). Diese Tendenz lässt darauf schließen, dass der EphA4-Rezeptor durch den rekombinanten Liganden in der CP/IMZ aktiviert wurde und dadurch die Proliferation und Differenzierung der apikalen Vorläuferzellen beeinflusste. Eine Aktivierung des EphA4-Rezeptors außerhalb der transienten, proliferativen Zonen ist somit denkbar.

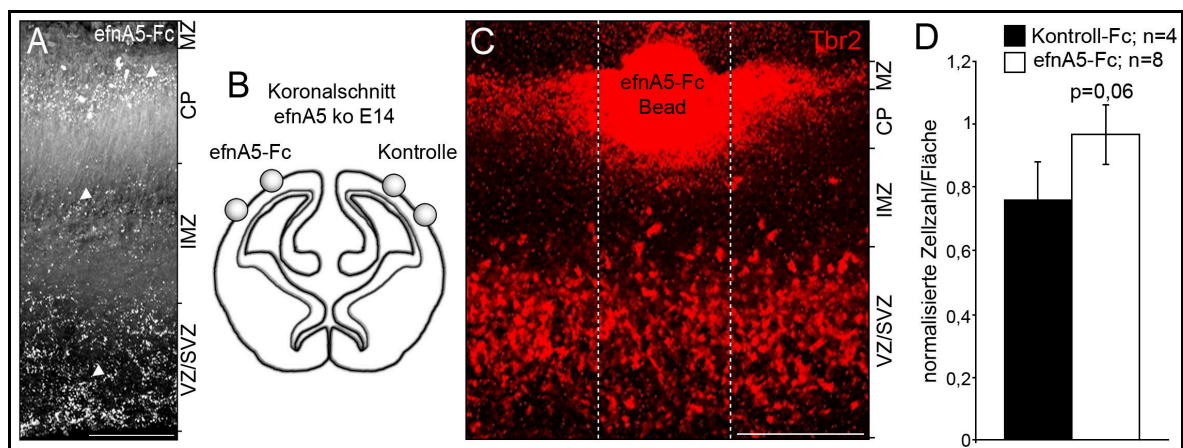


Abbildung 19: Ektopisches EphrinA5 in der CP/IMZ ist ausreichend um die EphA4-vermittelten proliferativen Effekte zu induzieren. Bindungsstudien sollten zeigen, wo EphrinA5-affine Interaktionspartner in Schnittekulturen vorhanden sind. Dazu wurde rekombinantes EphrinA5-Alexa488 auf organotypischen Schnittekulturen inkubiert und dann die Proteinverteilung analysiert. Das punktuelle Signal wurde im gesamten Kortex detektiert, mit einer Akkumulation in den proliferativen Zonen und in der CP/IMZ (A). Um zu untersuchen, ob ektopisches EphrinA5-Fc in der kortikalen Platte ausreichend ist, die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen *in vitro* zu beeinflussen, wurden organotypische Schnittekulturen EphrinA5-defizienter Embryonen an E14,5 angefertigt. In die kortikale Platte/obere IMZ wurden Agarosekugeln platziert, die entweder mit rekombinantem EphrinA5-Fc oder Kontrollprotein beschichtet waren (B). Nach zwei Tagen *in vitro* wurden die Schnittekulturen einer immunhistochemischen Markierung gegen Tbr2 unterzogen, einem Marker für basale Vorläuferzellen (C). Ermittelt wurde die Anzahl der basalen Vorläuferzellen pro Fläche, wobei die ermittelte Zellzahl unter den Agarosekugeln aufgrund des transversalen Entwicklungsgradienten auf gleichgroße laterale und mediale Bereiche normalisiert wurde. Die Quantifizierung zeigt tendentiell mehr Tbr2-reaktive Zellen unter den EphrinA5-Fc beschichteten Agarosekugeln (D). Resultate aus 2 unabhängigen Experimenten; T-Test,  $p=0,06$  (MW $\pm$ SEM); n=Anzahl der analysierten Schnitte. VZ=Ventrikularzone; SVZ=Subventrikularzone; IMZ=Intermediärzone, CP=Kortikale Platte, MZ=Marginalzone.

Die vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass thalamische Afferenzen während der Entwicklung des Neokortex die Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen durch das Einführen von extrakorikalem EphrinA5 regulieren. Die thalamischen Axone importieren den membrangebundenen Liganden EphrinA5 in den Kortex, wo eine Interaktion mit dem Bindungspartner EphA4 ermöglicht wird, der entlang der radialen Fortsätze glialer Vorläuferzellen lokalisiert ist. Durch die EphrinA5/EphA4 Interaktion wird der Rezeptor aktiviert, was zu Veränderungen der mitotischen Aktivität der Rezeptor-tragenden, kortikalen Vorläuferzellen führt, was wiederum die finale Anzahl an Neuronen der laminaren Schichten reguliert.

In dieser Arbeit konnten somit erste *in vivo* Evidenzen für eine subkortikale Regulation der Proliferation kortikaler Vorläuferzellen gezeigt werden, die durch EphA4/EphrinA5-Interaktion vermittelt wird und dadurch die finale Anzahl an postmitotischen Neuronen in den einzelnen kortikalen Schichten beeinflusst.

## 5 Diskussion

Im Verlauf der Neurogenese generieren kortikale Vorläuferzellen eine Vielzahl von morphologisch und funktionell unterschiedlichen Neuronen für die Schichten des zerebralen Neokortex. Die mitotische Aktivität der proliferierenden Zellen wird dabei durch eine Vielzahl intrinsischer und extrinsischer Faktoren beeinflusst, welche die Proliferation und sukzessive Differenzierung steuern. Es wurde bereits gezeigt, dass thalamische Afferenzen die Arealisierung des Kortex beeinflussen (O'Leary, 1989), jedoch ist wenig darüber bekannt, welchen Einfluss die thalamokortikale Projektion auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen hat. In dieser Arbeit werden erste Evidenzen vorgestellt, die eine exogene Regulation der Anzahl und Identität kortikaler Vorläufer durch einwachsende thalamische Axone vorschlagen, wodurch die laminare Organisation des Neokortex beeinflusst wird. Dabei wurden EphA4/EphrinA5-Interaktionen als mögliche Regulatoren des Zellschicksals kortikaler Vorläufer identifiziert. Während EphA4 von radialen Gliazellen exprimiert wird, die aufgrund ihrer Morphologie die embryonalen Schichten strukturell miteinander verbinden, konnte EphrinA5 in thalamischen Axonen detektiert werden, die während des Einwachsens in die IMZ den Liganden in den Neokortex importieren. Diese Ergebnisse deuten auf eine entwicklungsrelevante Funktion der EphA4/EphrinA5-Interaktionen während der embryonalen Schichtenbildung hin.

### 5.1 Ephrine beeinflussen die mitotische Aktivität kortikaler Vorläuferzellen

Eph-Rezeptortyrosinkinasen und ihre membrangebundenen Liganden werden lokal und zeitlich begrenzt in distinkten Domänen des embryonalen Gehirns exprimiert. Sie regulieren eine Vielzahl entwicklungsrelevanter Prozesse, wie Synaptogenese, axonale Lenkung und Wegfindung migrierender Interneurone (Castellani and Bolz, 1997; Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Kullander and Klein, 2002; Pasquale, 2005), sie wirken verzweigungsfördernd auf thalamische Afferenzen (Castellani and Bolz, 1996; Uziel et al., 2008) und sind in die Regulation von Apoptose, Proliferation und Differenzierung involviert (Depaepe et al., 2005; North et al., 2009; Park et al., 2013; Qiu et al., 2008). So wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Rezeptors EphA7 durch den Liganden EphrinA5 während der frühen Neurogenese an E12,5 die Apoptose kortikaler Vorläuferzellen fördert und dadurch die finale Anzahl der mitotisch aktiven Zellen *in vitro* beeinflusst (Depaepe et al., 2005). Weiterhin wurde für EphA4 beschrieben, dass der Rezeptor die Caspase-abhängige Apoptose fördert und dadurch die adulte Neurogenese in der SVZ reguliert, was jedoch durch die Bindung des affinen Liganden EphrinB3 inhibiert wird (Furne et al., 2009). Vergleichende Antikörpermarkierungen gegen den Apoptosemarker Caspase-3 ließen jedoch

keine Unterschiede in der Anzahl apoptotischer kortikaler Zellen in EphrinA5-defizienten Mäusen und vergleichbaren Kontrolltieren an E13,5 und E16,5 erkennen (Gerstmann et al., 2010; Daten nicht gezeigt.) Abweichungen im programmierten Zelltod scheinen daher nicht die Ursache für die ermittelte persistente Verschiebung der kortikalen Schichten in adulten EphrinA5-defizienten Mäusen zu sein.

Desweiteren sind verschiedene Vertreter der Ephrin-Familie in die parakrine Regulation kortikaler Vorläuferzellen involviert. Für das Signalmolekül EphrinB1 wurde bereits beschrieben, dass es in der Ventrikularzone exprimiert wird und durch EphB1-induziertes *reverse signaling* die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen aufrechterhält (Qiu et al., 2008). Mit einsetzender Neurogenese wird der Ligand in den mitotisch aktiven Zellen herunter reguliert. Ein Verlust der Proteinfunktion resultiert in vorzeitiger neuronaler Differenzierung. Vertreter der Ephrin-Familie scheinen somit in die zeitliche Regulation der Delamination und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen involviert zu sein und können dadurch die embryonale Schichtenbildung beeinflussen. Auch für die parakrine Aktivierung des EphA4-Rezeptors durch EphrinB1 wurde bereits beschrieben, dass dies die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen fördert und somit den Vorrat an neuronalen Stammzellen vergrößert (North et al., 2009). Außerdem stimulieren Ephrine die adulte Neurogenese und die Zellteilung im adulten olfaktorischen System (Conover et al., 2000) sowie im sich entwickelnden Hippocampus (Chumley et al., 2007). So weisen EphrinA5-defiziente Mäuse eine reduzierte mitotische Aktivität im postnatalen Hippocampus auf, die mit frühzeitiger Bildung postmitotischer Neurone verbunden ist (Hara et al., 2010). Ferner stellen die Liganden EphrinA2 und EphrinA3, welche in der SVZ des adulten Kortex und Hippocampus exprimiert werden, negative Regulatoren der adulten Neurogenese dar (Jiao and Chen, 2008). Ein Funktionsverlust dieser Proteine führt zu einer Aktivierung der Proliferation, weshalb die Manipulation des Ephrin-Signalweges einen interessanten Therapieansatz bei der Zellerneuerung nach Neurodegeneration darstellt.

Für EphA4/EphrinA5-Interaktionen wurde außerdem beschrieben, dass sie die Motilität und adhäsiven Eigenschaften kortikaler Neurone *in vitro* beeinflussen (Zimmer et al., 2007). Die Regulation der Adhäsion ist kritisch für die Balance zwischen Zellteilung und Differenzierung und somit für die korrekte Ausbildung postmitotischer Neurone. Funktion und Integrität des Neuroepithels sind von den adhäsiven Kontakten zwischen den neuronalen Stammzellen abhängig und die Regulation dieser *adherent junctions* beeinflusst die Proliferation und Differenzierung. Die Reduktion der Adhäsion führt zur Delamination aus dem Neuroepithel und frühzeitiger Neurogenese (Rousso et al., 2012; Stocker and Chenn, 2009; Zhang et al., 2010). Verschiedene Schlüsselkomponenten der *adherent junctions* wurden bereits identifiziert, die notwendig für Aufbau und Funktion dieser Zell-Zell-Kontakte sind. Ein essentieller Bestandteil dieser adhäsiven

Kontakte ist N-Cadherin und der Funktionsverlust dieses Proteins führt zu struktureller Desorganisation des Neuroepithels, zu frühzeitiger Delamination und zur Akkumulation ektopischer Neurone in der VZ (Rousso et al., 2012; Zhang et al., 2010). Für EphrinA5 wurde bereits beschrieben, dass es N-Cadherin während der Linsenentwicklung zu den *adherent junctions* rekrutiert (Cooper et al., 2008) und somit die Etablierung der Zell-Zell-Kontakte fördert. Die mögliche Funktion von EphA4/EphrinA5 bei der Regulation der Adhäsion kortikaler Vorläuferzellen könnte die Delamination steuern und dadurch die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung regulieren. Der Verlust von EphA4 oder EphrinA5 könnte dabei in einer reduzierten Adhäsion der neuronalen Vorläuferzellen resultieren und dadurch die Delamination und frühzeitige Differenzierung begünstigen. Dies steht in Übereinstimmung mit der erhöhten Anzahl postmitotischer Neurone, welche an E13,5 in EphrinA5-knockout Mäusen detektiert wurde und der Expansion der adulten infragranulären Schichten in EphrinA5- und EphA4-defizienten Mäusen.

## 5.2 EphA4/EphrinA5-Interaktionen regulieren die Balance von Proliferation und Differenzierung

In dieser Arbeit wurde das Signalmolekül EphrinA5 als potentieller Regulator der kortikalen Proliferation und Differenzierung identifiziert. Dabei konnte zunächst eine persistente Verschiebung der adulten Zytoarchitektur in EphrinA5-defizienten Mäusen detektiert werden, wobei eine Expansion der infragranulären Schichten auf Kosten reduzierter supragranulären Schichten ermittelt wurde (Gerstmann et al., 2010; Abbildung 5 A-C). Dies lieferte erste Hinweise, dass EphrinA5 in die Regulation der laminaren Organisation involviert ist. Bereits frühe Arbeiten belegen den Zusammenhang zwischen der zeitlichen Bildung der Projektionsneurone und ihrer laminaren Identität (McConnell, 1991). Früh geborene Neurone sind für die tiefen Schichten bestimmt, während später geborene Nervenzellen die oberen Schichten besiedeln (Polleux et al., 1997; Takahashi et al., 1999). Immunhistochemische Markierungen gegen Tbr1 an E13,5 haben gezeigt, dass die kortikale Platte EphrinA5-defizienter Mäuse dicker ist als die von Kontrolltieren (Abbildung 6 B-D), was mit einer erhöhten Anzahl an postmitotischen Neuronen korreliert, die zur frühen Neurogenese gebildet werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass EphrinA5-defiziente Mäuse während der Bildung der infragranulären Schichten vermehrt Neurone generieren. Es wurde bereits beschrieben, dass eine gesteigerte Austrittsrate aus dem Zellzyklus zur frühen Neurogenese mit einer erhöhten Anzahl postmitotischer Neurone in den tiefen Schichten assoziiert ist (Mairet-Coello et al., 2012; Tury et al., 2011).

Im Gegensatz dazu weisen vergleichende *birthdating* Experimente an E16,5 darauf hin, dass im EphrinA5-knockout während der späten Kortikogenese weniger Vorläuferzellen den Zellzyklus verlassen (Abbildungen 6 E-G). Das wiederum deutet an, dass in EphrinA5-knockout Tieren zur



späten Neurogenese weniger Projektionsneurone für die supragranulären Schichten gebildet werden. Diese Experimente sind somit konsistent mit der beobachteten Verschiebung der adulten Zytoarchitektur in EphrinA5-knockout Mäusen und weisen auf eine regulatorische Funktion des Signalmoleküls EphrinA5 auf die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen hin.

Durch RT-PCR konnte das Signalmolekül EphrinA5 bereits an E13,5 in kortikalem Gewebe nachgewiesen werden (Abbildung 14 C). Jedoch haben Untersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung (Abbildung 14 A, B) und RT-PCR an isolierten, kortikalen Vorläuferzellen (Abbildung 14 D) ergeben, dass EphrinA5 selber nicht in den transienten, proliferativen Zonen des sich entwickelnden Embryos exprimiert wird. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Expressionsstudien, die ebenfalls keine EphrinA5-Expression durch kortikale Vorläufer detektieren konnten (Deschamps et al., 2009; Deschamps et al., 2010; North et al., 2009). Da ein Effekt auf die Balance von Proliferation und Differenzierung in EphrinA5-defizienten Mäusen beobachtet wurde, deutet dies auf die Expression eines EphrinA5-affinen Interaktionspartners durch kortikale Vorläuferzellen hin. Für Eph- Rezeptortyrosinkinasen und ihre membrangebundenen Liganden wurde bereits beschrieben, dass bidirektionale Aktivierungsereignisse möglich sind (Davy and Soriano, 2005; Holland et al., 1996; Kullander and Klein, 2002). Das bedeutet, dass durch *forward signalling* eine Signalkaskade in der Rezeptor-tragenden Zelle ausgelöst werden kann und durch *reverse signalling* in der Liganden-exprimierenden Zelle. Der Bindungspartner von EphrinA5 scheint durch klassische Ligandenbindung aktiviert zu werden und dadurch die Proliferation durch *forward signalling* zu beeinflussen. Das würde bedeuten, dass der in EphrinA5-knockout Mäusen detektierte Phänotyp nur ein indirekter Effekt durch verminderte Aktivierung des affinen Interaktionspartners darstellt. Nach dieser Hypothese sollte ein Funktionsverlust dieses Rezeptors einen stärkeren Phänotyp hervorrufen als der Verlust des interagierenden Liganden EphrinA5.

Neben allen Rezeptoren des A-Systems ist auch EphB2 ein potentieller Bindungspartner von EphrinA5 (Gale et al., 1996; Himanen et al., 2004). Deshalb wurde zunächst mittels *in situ* Hybridisierung an E14,5 das Expressionsmuster aller potentiellen Bindungspartner des Signalmoleküls EphrinA5 untersucht, um zu analysieren, welcher Rezeptor in den transienten, proliferativen Zonen des sich entwickelnden Neokortex exprimiert wird (Abbildung 11). Die Studie ergab, dass lediglich EphA4 zum untersuchten Entwicklungszeitpunkt eine stabile Expression in den proliferativen Zonen aufwies. Zudem wurde für EphA4 bereits beschrieben, dass die Aktivierung des Rezeptors die Proliferation fördert (North et al., 2009). Eine Analyse der radialen Ausdehnung der kortikalen Organisation ergab in EphA4-defizienten Tieren, analog zum EphrinA5-knockout, eine Expansion der infragranulären Schichten, bei gleichzeitiger Reduktion der supragranulären Schichten (Abbildung 12). Diese Verschiebung der kortikalen Organisation war in EphA4-knockout Tieren sogar noch stärker ausgeprägt. Der vergleichbare Phänotyp deutet darauf

hin, dass die Aktivierung des EphA4-Rezeptors durch EphrinA5 in die Regulation der Proliferation und dadurch in die Ausbildung der kortikalen Schichtung involviert ist. Die dargestellten Ergebnisse schlagen ein EphrinA5-induziertes EphA4 *forward signalling* vor, wobei eine parakrine Aktivierung, wie sie bereits für EphA4/EphrinB1-Interaktionen beschrieben wurde (North et al., 2009), aufgrund der dargestellten Expressionsmuster eher unwahrscheinlich ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen EphA4 und EphrinA5 die Balance zwischen Proliferation und Delamination steuert und dadurch in die zeitliche Regulation der kortikalen Schichten involviert ist.

### **5.3 Radiale Gliazellen dienen als strukturelle Verbindung der embryonalen Zonen**

Eine wichtige Frage die es zu beantworten galt war, wie die potentielle Interaktion zwischen EphrinA5 und seinem EphA4-Rezeptor zustande kommt, da diese nicht überlappend in unterschiedlichen embryonalen Zonen detektiert wurden. Während EphA4 in den transienten proliferativen Zonen exprimiert wird (Abbildung 13 A), konnte keine EphrinA5-Expression durch kortikale Vorläuferzellen in diesen Arealen ermittelt werden (Abbildung 14 A, B). Diese Resultate zeigen, dass der Ligand außerhalb der proliferativen Zonen lokalisiert ist. Bereits Seuntjens et al., (2009) haben ein *feedback signalling* beschrieben, bei dem postmitotische Neurone der kortikalen Platte die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen regulieren, jedoch blieb der zugrunde liegende Mechanismus ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden radiale Gliazellen als strukturelle Verbindung zwischen den embryonalen Zonen identifiziert, die durch ihre morphologischen Eigenschaften eine lokale Interaktion zwischen Vorläufern und Faktoren außerhalb der transienten, proliferativen Zonen ermöglichen.

Der apikale Fortsatz der radialen Gliazellen bestimmt die Lokalisation und den Teilungsmodus einer radialen Gliazelle. Außerdem ist bereits bekannt, dass der Apikalkomplex in den lateralen Ventrikel ragt und dadurch Wachstumsfaktoren und proliferationsfördernde Signale aus der zerebrospinalen Flüssigkeit rezipiert (Lehtinen and Walsh, 2011; Tiberi et al., 2012). Die vorliegende Arbeit schlägt eine Funktion des basalen Fortsatzes bei der Wahrnehmung externer Faktoren aus der Intermediärzone und kortikalen Platte vor. Doppelmarkierungen an E14,5 gegen EphA4 und Nestin in koronalen embryonalen Gehirnschnitten (Abbildung 14 B) sowie an kortikalen Einzelzellen (Abbildung 14 C) haben ergeben, dass der Rezeptor von radialen Gliazellen exprimiert wird und entlang der basalen glialen Fortsätze lokalisiert ist, welche den gesamten Kortex durchspannen. Dadurch ist der membranständige Rezeptor im gesamten, embryonalen Kortex präsent und kann auch außerhalb der proliferativen Zonen mit potentiellen Bindungspartnern interagieren. Somit wird ein Kontakt des EphA4-Rezeptors mit seinem affinen Liganden EphrinA5 in der IMZ möglich.

Um diese Hypothese zu testen, wurde ein eleganter *in vitro* Versuch durchgeführt. Dabei wurden EphrinA5-Fc oder mit Kontrollprotein beschichtete Agarosekügelchen in die CP/IMZ von lebenden Schnittkulturen EphrinA5-defizienter Mäuse an E14,5 platziert und die Auswirkung auf die Identität kortikaler Vorläuferzellen mittels Tbr2-Markierung analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass ektopisches EphrinA5-Fc in der CP/IMZ ausreicht, um die Proliferation zu beeinflussen, da unter den EphrinA5-Fc beschichteten Agarosekügelchen eine erhöhte Anzahl Tbr2-reaktiver basaler Intermediärzellen detektiert wurde (Abbildung 19 D). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass EphrinA5 den Rezeptor EphA4 auch außerhalb der transienten proliferativen Zonen aktivieren kann und dadurch die Anzahl und Identität kortikaler Vorläuferzellen beeinflusst. EphA4/EphrinA5-Interaktionen stellen somit einen potentiellen Aktivator der kortikalen Proliferation dar, während der Funktionsverlust dieser Proteine in frühzeitiger Delamination und Differenzierung resultiert. Radiale Gliazellen bieten dabei eine geeignete Gerüststruktur, die eine Interaktion von EphA4 und EphrinA5 außerhalb der proliferativen Zonen ermöglicht. Auch andere Oberflächenmoleküle aus der kortikalen Platte und IMZ könnten so auf die kortikalen Vorläuferzellen einwirken. Beispielsweise werden auch Faktoren der Meningen von den basalen glialen Fortsätzen rezipiert und beeinflussen dadurch die Proliferation und neuronale Differenzierung der radialen Gliazellen (Barakat et al., 1981; Gensburger et al., 1986; Radakovits et al., 2009).

#### **5.4 Kortikale Vorläuferzellen und laminare Identität**

In verschiedenen Publikationen wurde bereits berichtet, dass eine quantitative Veränderung verschiedener Vorläuferstypen die radiale Ausdehnung der kortikalen Schichten beeinflussen kann. So wurde beschrieben, dass eine Dezipierung der basalen Vorläuferzellen in reduzierten supragranulären Schichten resultiert (Georgala et al., 2010), was konsistent mit den hier dargestellten Ergebnissen ist. Auch in EphrinA5-defizienten Mäusen wurde eine Reduktion der basalen Vorläufer an E16,5 detektiert (Abbildung 7 F, G), die mit einer Verschiebung der adulten kortikalen Schichten assoziiert ist. Jedoch ist bisher wissenschaftlich umstritten, welchen Beitrag apikale und basale Vorläuferzellen für die finale Anzahl der exzitatorischen Projektionsneurone in den verschiedenen kortikalen Schichten leisten. Es wurden bereits verschiedene Proteine identifiziert, welche die Differenzierungsprogramme neuronaler Vorläuferzellen beeinflussen. Die apikalen Vorläuferzellen generieren durch asymmetrische proliferative Teilung basale Intermediärzellen, die ihren Zellkörper in die SVZ translozieren (Frantz et al., 1994; Götz and Huttner, 2005). Interessanterweise ist der Transkriptionsfaktor Pax6, der exklusiv in apikalen Vorläuferzellen exprimiert wird, essentiell für die Generierung der korrekten Anzahl an basalen Intermediärzellen (Quinn et al., 2007) und für die Produktion von Projektionsneuronen, die für die

supragranulären Schichten bestimmt sind (Schuermans et al., 2004). Pax6 wird jedoch selber in Tbr2-reaktiven basalen Vorläufern herunter reguliert (Sansom et al., 2009). Interessanterweise wurde für EphrinA5-defiziente Mäuse bereits beschrieben, dass sie eine verringerte Pax6-Expression aufweisen (Peuckert et al., 2008). Da der Transkriptionsfaktor kritisch für die Ausbildung basaler Intermediärzellen ist (Quinn et al., 2007) könnte eine verminderte intrazelluläre Proteinkonzentration zu einer reduzierten Bildung der basalen Vorläufer führen, wie sie in EphrinA5-defizienten Mäusen ermittelt wurde.

Radiale Gliazellen exprimieren neurogenetische Marker, die später auch Neuronen der tiefen postnatalen Schichten aufweisen, wie beispielsweise Otx-1/2, Emx2, Sox1 oder Fezf2 (Chen et al., 2005; Dehay and Kennedy, 2007; Frantz et al., 1994; Leingartner et al., 2003). Während der mittleren und späten neokortikalen Entwicklung, mit Erscheinen der ersten Intermediärzellen, exprimiert die SVZ neurogenetische Marker, wie zum Beispiel Cux1, Cux2, Satb2 oder Svet1, welche auch die adulten supragranulären Schichten aufweisen (Britanova et al., 2008; Nieto et al., 2004; Seuntjens et al., 2009; Tarabykin et al., 2001). Tarabykin et al. (2001) haben gezeigt, dass der Funktionsverlust von Svet1 dazu führt, dass die supragranulären Schichten nicht ausgebildet werden. Zusätzlich expandiert die SVZ bevorzugt während der Generierung der oberen Schichten (Dehay and Kennedy, 2007; Lukaszewicz et al., 2006; Takahashi et al., 1999). Diese Daten stützen die Hypothese, dass die Intermediärzellen in der SVZ die Neurone der supragranulären Schichten bilden, während Projektionsneurone der unteren Schichten aus radialen Gliazellen der VZ hervorgehen (Nieto et al., 2004; Tarabykin et al., 2001; Zimmer et al., 2004).

Einige Resultate der vorliegenden Arbeit sprechen ebenfalls für diese Theorie. Beispielsweise wurde die Verteilung von Vorläuferzellen in WT und EphrinA5-knockout vergleichend untersucht. Dabei deutete eine immunhistochemische Markierung gegen den Proliferationsmarker Ki67 auf eine Verschiebung der Vorläuferzellen in EphrinA5-defizienten Mäusen hin. Diese wiesen eine erhöhte Anzahl an mitotisch aktiven Zellen in der VZ auf, bei einem gleichzeitig reduzierten Anteil an SVZ-Vorläufern (Abbildung 7 A-C). Die differierende Anzahl mitotisch aktiver Zellen im KO ist konsistent mit der Anzahl an apikalen und basalen Vorläuferzellen, die darauffolgend im dorsolateralen Kortex von EphrinA5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren untersucht wurde. Hier zeigte sich, dass EphrinA5-knockout Mäuse mehr Pax6-positive apikale Vorläuferzellen in der VZ aufwiesen (Abbildungen 7 D, E). Gleichzeitig deutete eine Färbung gegen den Marker Tbr2 an, dass EphrinA5-knockout Mäuse eine verringerte Anzahl an basalen Intermediärzellen in der SVZ besitzen (Abbildungen 7 F, G). Die verschobene Anzahl an kortikalen Vorläufersubtypen korreliert mit einer Expansion der adulten infragranulären Schichten, bei einer gleichzeitigen Reduktion der supragranulären Schichten. Daher weisen die Daten darauf hin, dass die apikalen Vorläuferzellen

aus der VZ hauptsächlich die tiefen Schichten generieren, während die Intermediärzellen der SVZ die meisten Neurone der oberen Schichten bilden.

Im Gegensatz dazu zeigen andere Arbeiten, dass basale Intermediärzellen bereits sehr früh während der Kortikogenese im embryonalen Neuroepithel nachweisbar sind und zu diesem Zeitpunkt Neurone der infragranulären Schichten produzieren, gemäß dem zeitlichen Verlauf der Neurogenese (Farkas and Huttner, 2008; Haubensak et al., 2004; Kowalczyk et al., 2009; Noctor et al., 2004). Es wird sogar postuliert, dass basale Vorläuferzellen den Hauptanteil exzitatorischer Projektionsneurone generieren und lediglich 10 % aller Neurone direkt von radialen Gliazellen abstammt (Kowalczyk et al., 2009). Da basale Intermediärzellen von radialen Gliazellen generiert werden (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004; Smart, 1972), scheinen diese Zelltypen eher verschiedene Stadien differenzierter Vorläufer darzustellen, als abgegrenzte Populationen (Franco et al., 2012). Diese Interpretation wird durch eine molekulare Studie gestützt, bei der Subtypen radialer Gliazellen identifiziert wurden, welche unterschiedliche Expressionsmuster aufwiesen und differierende Mengen basaler Intermediärzellen oder Neurone generierten (Pinto et al., 2008).

Elegante *tracing* Experimente haben außerdem gezeigt, dass ein heterogener Vorrat an radialen Gliazellen existiert (Franco et al., 2012) der durch die Expression molekularer Marker determiniert wird. Es konnte gezeigt werden, dass manche dieser apikalen Vorläufer Cux2 exprimieren (Franco et al., 2012; Nieto et al., 2004) und bereits darauf geprägt sind, nur Neurone der supragranulären Schichten zu generieren (Franco et al., 2012). Die Cux2-negativen Zellen produzieren während der frühen Neurogenese Nervenzellen für die infragranulären Schichten, während Cux2-positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt proliferative symmetrische Teilungen vollziehen und erst während der Bildung der oberen Schichten Neurone produzieren. Diese Experimente unterstützen die Hypothese, dass Neurone mehr durch ihre molekularen Eigenschaften determiniert werden, als durch den Zeitpunkt der Geburt.

In EphrinA5-defizienten Mäusen wurde an E16,5 eine erhöhte Anzahl apikaler Vorläufer detektiert, auf Kosten einer reduzierten Anzahl basaler Intermediärzellen. Jedoch wurde keine weitere Spezifizierung der Vorläufersubtypen vorgenommen. Die differierenden Mengen neuronaler Vorläufer korrespondiert mit einer persistenten Verschiebung der kortikalen Schichten, deshalb unterstützen die dargestellten Resultate die Hypothese, dass der Hauptteil der supragranulären Schichten durch basale Intermediärzellen generiert wird, während die meisten Projektionsneurone der infragranulären Schichten von radialen Gliazellen abstammen.

### 5.5 Die Relevanz der Teilungssymmetrie für die Anzahl und Identität kortikaler Vorläuferzellen und postmitotischer Neurone

Die Symmetrie der Zellteilung wird durch die Orientierung der Mitosespindel determiniert und ist entscheidend für die Prädestination der generierten Tochterzellen (Götz and Huttner, 2005; Merot et al., 2009), sowie für die finale Anzahl kortikaler Vorläuferzellen und postmitotischer Neurone, die zu einem determinierten Zeitpunkt gebildet werden (Chenn and McConnell, 1995; Rakic, 1995; Takahashi et al., 1996). Die Orientierung der Mitosespindel und Proliferationsebene sind kritisch für das Schicksal der resultierenden Tochterzellen und für die korrekte Bildung der laminaren Zytoarchitektur (Götz and Huttner, 2005; Rakic, 1988). Welche Faktoren die Teilungssymmetrie beeinflussen und den Wechsel von proliferativer zu neurogener Teilung regulieren, ist weitestgehend unbekannt.

Die asymmetrische Proliferation ist essentiell für die Etablierung unterschiedlicher Zelltypen. Es gibt bereits Hinweise, dass Ephrine in die Regulation der Teilungssymmetrie involviert sind. So induziert EphrinB1 *reverse signaling* die Transition von proliferativer symmetrischer Teilung zu neurogener asymmetrischer Teilung (Qiu et al., 2008). Außerdem ist bekannt, dass EphrinB1 und EphrinB2 die Aktivität des Par-Protein-Komplexes regulieren (Lee and Daar, 2009; Lee et al., 2008; Nakayama and Berger, 2013), welcher an den apikalen Fortsätzen radialer Gliazellen angereichert ist (Götz and Huttner, 2005) und die proliferative Teilung, sowie die Bildung basaler Intermediärzellen fördert (Costa et al., 2010). Weiterhin wurde für EphrinA5 gezeigt, dass es in die Etablierung unterschiedlicher Zelltypen durch asymmetrische Teilungen im Neuralrohr und Notochord von *Ciona intestinalis* involviert ist (Picco et al., 2007; Shi and Levine, 2008) und dabei die Generierung neuronaler Zellen fördern.

Die vorliegende Arbeit postuliert einen Einfluss von EphrinA5-induzierter EphA4-Aktivität auf den Teilungsmodus glialer Vorläuferzellen. Anhand immunhistochemischer Markierungen gegen den Spindelpolmarker Aspm in Kombination mit DAPI-Kernfärbung wurde die Teilungsebene apikaler Vorläuferzellen in WT und EphrinA5-knockout Tieren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der Funktionsverlust von EphrinA5 an E13,5 in einer erhöhten asymmetrischen Zellteilung resultiert (Abbildung 8). Ein funktioneller *pair-cell* Assay zeigte, dass die Zugabe von rekombinantem EphrinA5-Fc zu einer erhöhten proliferativen Teilung führte (Abbildung 9). Im Gegensatz dazu verursacht der Funktionsverlust des Liganden gesteigerte neurogene Teilung, was mit einer erhöhten Anzahl postmitotischer Neurone an E13,5 in EphrinA5-defizienten Mäusen korreliert.

Es ist wenig darüber bekannt, welche Faktoren die Transition von proliferativer zu neurogener Teilung regulieren. Ein Faktor, der diesen Übergang fördert, ist die Dauer eines Zellzyklus. Mit fortschreitender Neurogenese wird der Zellzyklus länger und determinierende Faktoren nehmen mehr Einfluss auf die Identität der resultierenden Tochterzellen (Calegari et al., 2005; Calegari and

Huttner, 2003; Kornack and Rakic, 1998; Takahashi et al., 1996). In EphrinA5-defizienten Mäusen wurde ein frühzeitiger Wechsel zur asymmetrischen neurogenen Proliferation detektiert, was mit einer erhöhten Neuronenproduktion während der Bildung der tiefen Schichten korreliert. Jedoch konnten keine Unterschiede in der Zellzykluslänge von WT und KO ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Bildung von proliferativen Zellen und postmitotischen Neuronen scheint weder an einen bestimmten kortikalen Vorläufersubtyp gekoppelt zu sein, noch an einen Teilungsmodus. Radiale Gliazellen vollziehen je nach Entwicklungszeitpunkt jede Art der Zellteilung, jedoch proliferieren sie bevorzugt asymmetrisch, wohingegen sich sogenannte *short neuronal precursors* (SNPs) meist symmetrisch teilen (Cai et al., 2002). Während radiale Gliazellen durch asymmetrische Teilung sowohl postmitotische Neurone, als auch basale Intermediärzellen hervorbringen, vergrößern SNPs zur frühen Neurogenese die Population neuronaler Stammzellen, während sie zu späteren Entwicklungszeitpunkten zumeist postmitotische Neurone durch terminale Proliferation produzieren (Noctor et al., 2004). Auch basale Intermediärzellen teilen sich symmetrisch und generieren dabei zumeist zwei postmitotische Neurone (Götz and Huttner, 2005; Haubensak et al., 2004; Haydar et al., 2003; Noctor et al., 2004; Smart, 1972; Takahashi et al., 1996). Jedoch existiert ein geringer Anteil basaler Vorläuferzellen, die symmetrische proliferative Teilung vollziehen (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004) und dadurch wiederum zwei basale Vorläuferzellen produzieren. Es wird angenommen, dass die Intermediärzellen im Verlauf der evolutionären Entwicklung des Neokortex durch zusätzliche proliferative Teilungen die Anzahl kortikaler Projektionsneurone und dadurch die Expansion der supragranulären Schichten in Menschen und anthropoiden Affen gesteigert haben (Smart et al., 2002).

Eine *in situ* Hybridisierung gegen das Neurogen Insm-1, welches spezifisch symmetrisch neurogen proliferierende Vorläufer markiert (Farkas et al., 2008; Rosenbaum et al., 2011), färbt sowohl apikale Vorläufer in der VZ, als auch basale Intermediärzellen in der SVZ (Abbildung 10). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die terminierenden Programme am Ende der Kortikogenese in verschiedenen Vorläufersubtypen ähnlich sind. Die *in situ* Hybridisierung gegen Insm-1 zeigte außerdem eine Reduktion der terminalen Proliferation in EphrinA5-defizienten Mäusen, was mit der verringerten Anzahl basaler Intermediärzellen korreliert, die im KO an E16,5 ermittelt wurde (Abbildung 7 F,G). Durch die verringerte terminale Teilung zur späten Neurogenese wird eine verminderte Anzahl exzitatorischer Projektionsneurone produziert, die entsprechend ihres Bildungszeitpunktes die superfiziellen Schichten besiedeln. Das verminderte Insm-1 Signal in der SVZ ist daher konsistent mit den reduzierten oberen Schichten adulter EphrinA5-defizienter Mäuse.

Die dargestellten Ergebnisse schlagen eine mögliche, regulatorische Funktion der EphrinA5/EphA4-Aktivität auf den Teilungsmodus kortikaler Vorläuferzellen vor. Die Interaktion könnte den Übergang von proliferativer zu neurogener Teilung beeinflussen und somit die finale Anzahl an basalen Vorläuferzellen und exzitatorischen Projektionsneuronen determinieren. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass EphrinA5-induzierte EphA4-Aktivität die Proliferation apikaler Vorläuferzellen aufrecht erhält, während ein Funktionsverlust dieser Proteine in einer frühzeitigen Generierung postmitotischer Neurone resultiert und dadurch die Formierung der kortikalen Schichten beeinflusst.

### **5.7 Die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen wird durch einwachsende thalamische Afferenzen reguliert**

Zahlreiche Faktoren wurden bereits identifiziert, welche die Proliferation und Identität einer kortikalen Vorläuferzelle regulieren. Intrinsische Signalwege und Transkriptionsfaktoren beeinflussen den Verlauf und die Geschwindigkeit des Zellzyklus und somit die Zellteilung und zeitliche Bildung von Projektionsneuronen. Die Regulation der Proliferation durch die parakrine Aktivierung benachbarter Vorläuferzellen wurde bereits für EphrinB1, EphB1 und EphA4 beschrieben (North et al., 2009; Qiu et al., 2008). Während EphrinB1 stark in den kortikalen Vorläuferzellen exprimiert wird, sind die meisten Ephrin-Liganden nicht in den transienten, proliferativen Zonen nachweisbar. Übereinstimmend mit anderen Studien (Deschamps et al., 2009; Deschamps et al., 2010; North et al., 2009) wurde auch in dieser Arbeit kein EphrinA5 in den kortikalen Vorläuferzellen detektiert. Somit ist eine EphrinA5-induzierte Aktivierung des EphA4-Rezeptors durch parakrine Interaktionen benachbarter Zellen undenkbar.

Weiterhin ist eine Vielzahl an extrinsischen Faktoren bekannt, welche die Proliferation und Differenzierung mitotisch aktiver Zellen regulieren. So wurde beschrieben, dass postmitotische Neurone aus der kortikalen Platte die proliferativen Eigenschaften kortikaler Vorläufer beeinflussen. Der Transkriptionsfaktor Sip1 wird von Neuronen der infragranulären Schichten exprimiert und beeinflusst das Zellschicksal radialer Gliazellen (Seuntjens et al., 2009), jedoch konnte der Mechanismus nicht aufgeklärt werden, wie der nukleare Transkriptionsfaktor die Proliferation der glialen Zellen beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit konnte EphrinA5 weder durch *in situ* Hybridisierung, noch mittels Transkriptionsanalyse neuronaler Einzelzellen in postmitotischen Neuronen nachgewiesen werden. Somit scheint auch eine EphrinA5-abhängige Regulation der mitotischen Aktivität radialer Gliazellen durch postmitotische Neurone aus der kortikalen Platte eher undenkbar.

Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass migrierende, glutamaterge Neurone (Teissier et al., 2012) und invadierende Interneurone (Haydar et al., 2000) die Proliferation kortikaler



Vorläuferzellen beeinflussen können. Hinzu kommt, dass der Neurotransmitter GABA selbst die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen steuert (Haydar et al., 2000; Wang and Kriegstein, 2009). Das bedeutet, dass einmigrierende inhibitorische Interneurone die Proliferation kortikaler Vorläufer beeinflussen könnten. Da gezeigt wurde, dass EphrinA5 auch im basalen Telenzephalon exprimiert wird, was konsistent mit früheren Studien ist (Zimmer et al., 2008), wurde eine mögliche Regulation der Proliferation durch einwandernde Interneurone, welche den A-Liganden in den Neokortex importieren, in Betracht gezogen. Jedoch zeigte eine Markierung gegen Calbindin, einen Marker für unreife Interneurone (Anderson et al., 1997; Faux et al., 2010), dass die inhibitorischen Zellen zum analysierten Entwicklungszeitpunkt noch nicht den dorsolateralen Kortex erreicht haben (Abbildung 15 A-C), wo die proliferativen Defekte zu dem untersuchten Entwicklungsstadium bereits ermittelt wurden. Eine Regulation durch importiertes EphrinA5 von kortikalen Interneuronen ist daher eher unwahrscheinlich.

Da EphrinA5 bereits früh während der Neurogenese an E13,5 in der Mantelzone des sich entwickelnden Thalamus exprimiert wird (Abbildung 16 D), in der ebenfalls thalamokortikale Fasern detektiert werden konnten (Abbildung 16 E), wurde auch der Einfluss thalamokortikaler Afferenzen auf die mitotische Aktivität neuronaler Vorläuferzellen untersucht. Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass thalamische Axone die Proliferation muriner, kortikaler Vorläuferzellen regulieren (Dehay et al., 2001). So wurde auch für das Oberflächenmolekül L1, welches entlang thalamokortikaler Fasern lokalisiert ist, beschrieben, dass es die Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen fördert (Dihne et al., 2003). Um einen möglichen Einfluss thalamokortikaler Afferenzen auf die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen zu analysieren, wurden zunächst mit Hilfe von Dil *Tracing*-Experimenten Fasern vom Kortex bis hin zum Thalamus visualisiert (Abbildung 16 F). Der Farbstoff akkumulierte im thalamischen ventrobasalen Kernkomplex, der bereits beschrieben ist, den somatosensorischen Kortex zu innervieren (Uziel et al., 2006). Interessanterweise wurde auch die Expression von EphrinA5 in diesem ventrobasalen Kernkomplex nachgewiesen (Abbildung 16 G). Das deutet an, dass der Thalamus während der Neurogenese den Liganden durch die thalamokortikale Innervation in den Kortex importiert. Die Präsenz von EphrinA-Liganden auf thalamischen Axonen wurde durch Bindungsstudien mit rekombinantem EphrinA3-Fc bestätigt (Abbildung 17 D). Mittels Syto® konnten zudem lokale mRNA-Granula entlang der thalamischen Fasern detektiert werden (Abbildung 18 A). Die ist konsistent mit aktuellen Studien, welche den Transport und die lokale Translation axonaler mRNAs bereits für verschiedene Signalmoleküle, unter anderem auch für einige Ephrine, beschrieben haben (Jung et al., 2012). Dieser Mechanismus gewährleistet eine schnelle Reaktion auf Umwelteinflüsse und Signalmoleküle während der Navigation von Wachstumskegeln sowie bei der axonalen Elongation und der Synaptogenese (Jung et al., 2012). Deshalb sollte mittels RT-

PCR die Präsenz von EphrinA5-mRNA in thalamischen Axonen analysiert werden. Und tatsächlich fanden sich Transkripte des Liganden in den isolierten, thalamischen Axonen (Abbildung 18 C). Die Daten deuten darauf hin, dass EphrinA5 im Thalamus exprimiert wird und entlang der thalamokortikalen Axone lokalisiert ist. Somit ist es denkbar, dass der Thalamus den Liganden in die IMZ des sich entwickelnden Neokortex importiert.

Die Invasion der thalamokortikalen Projektion korreliert mit der zeitlichen Generierung exzitatorischer Projektionsneurone während der Neurogenese. Es wurde bereits beschrieben, dass thalamokortikale Pionieraxone während der frühen Neurogenese in den Kortex einwachsen bevor die Hauptanzahl der Projektionsneurone entsteht (Auladell et al., 2000; Shatz and Luskin, 1986). Die Bildung der exzitatorischen Neurone erfolgt in der Maus zwischen E11-E18 (Polleux et al., 1997; Takahashi et al., 1999). Die ersten thalamischen Axone erreichen den dorsolateralen Kortex bereits an E13, wachsen tangential in die IMZ ein und beginnen an E14 die kortikale Subplatte zu invadieren (Auladell et al., 2000). Das bedeutet, dass thalamische Fasern bereits während der frühen Neurogenese Einfluss auf die kortikale Proliferation nehmen können. Diese Daten sind konsistent mit durchgeführten Markierungen gegen L1, die thalamokortikale Afferenzen schon an E13,5 im dorsolateralen Kortex zeigen (Abbildung 16 A). Dies deutet darauf hin, dass die ersten Pionieraxone an E13,5 bereits in den dorsolateralen Kortex eingewachsen sind. Konsistent mit diesen Ergebnissen konnten die ersten proliferativen Unterschiede in EphrinA5-defizienten Mäusen an E13,5 beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine extrakortikale Regulation der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen durch invadierende, thalamische Afferenzen hin, welche die finale Anzahl exzitatorischer Projektionsneurone der einzelnen Schichten beeinflusst. Dabei wird extrakortikales EphrinA5 von einwachsenden, thalamokortikalen Fasern in den sich entwickelnden Neokortex importiert. In der IMZ findet eine EphrinA5-induzierte Aktivierung des EphA4-Rezeptors entlang der glialen Fortsätze statt, wodurch die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen reguliert wird. Der Funktionsverlust eines dieser Proteine führt zu einer mangelnden Aktivierung der Proliferation und resultiert in einer frühzeitigen Differenzierung, die mit einer persistenten Verschiebung der adulten kortikalen Schichten assoziiert ist. Die Daten weisen somit auf eine entwicklungsrelevante Funktion der thalamokortikalen Afferenzen bei der embryonalen Schichtenbildung hin.

## 6 Zusammenfassung

Während der embryonalen Kortikogenese generieren kortikale Vorläuferzellen eine Vielzahl morphologisch und funktionell unterschiedlicher Neurone. Viele intrinsische und extrinsische Faktoren wurden bereits identifiziert, welche die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung kortikaler Vorläuferzellen regulieren und dadurch die Anzahl und Identität postmitotischer Neurone beeinflussen. Während es wissenschaftlich anerkannt ist, dass einwachsende thalamokortikale Projektionen während der späten Kortikogenese in die Determinierung kortikaler Areale und das Überleben postmitotischer Neurone involviert sind (O'Leary, 1989; Sato et al., 2012), ist nur wenig über den Einfluss der thalamischen Innervation auf die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen bekannt. In dieser Arbeit werden erste Evidenzen für eine extrakortikale Regulation der Proliferation und Identität neuronaler Vorläuferzellen durch einwachsende thalamische Axone vorgestellt, wodurch die Ausbildung der laminaren Organisation beeinflusst wird.

Eph-Rezeptortyrosinkinasen und ihre membrangebundenen Liganden werden weitläufig im embryonalen Gehirn exprimiert und sind in die Regulation zahlreicher neuronaler Entwicklungsprozesse involviert. In dieser Arbeit wurde das Signalmolekül EphrinA5 als potentieller Regulator der kortikalen Proliferation und Differenzierung identifiziert, welcher die radiale Ausdehnung der infra- und supragranulären Schichten kontrolliert (Gerstmann et al., 2010). EphrinA5-defiziente Mäuse weisen an E16,5 eine erhöhte Anzahl apikaler Vorläuferzellen auf und eine Reduktion der basalen Intermediärzellen. Außerdem generieren EphrinA5-knockout Tiere während der Bildung der infragranulären Schichten an E13,5 mehr postmitotische Neurone, während an E16,5 weniger exzitatorische Projektionsneurone für die supragranulären Schichten produziert werden. Diese Veränderungen in der Austrittsrate aus dem Zellzyklus zur frühen und späten Neurogenese korrelieren mit einer persistenten Schichtenverschiebung im adulten Kortex. Untersuchungen des Teilungsmodus haben ergeben, dass gliale Vorläuferzellen EphrinA5-defizienter Mäuse bevorzugt asymmetrisch proliferieren und vorrangig exzitatorische Neurone generieren, auf Kosten einer Dezimierung basaler Intermediärzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde EphA4 als der Effekt-vermittelnde Rezeptor identifiziert. EphA4 wird von radialen Gliazellen exprimiert und ist in der Zellmembran entlang der glialen Fortsätze lokalisiert, welche den gesamten Kortex radial durchspannen und somit die embryonalen Schichten strukturell miteinander verbinden. Dadurch wird eine lokale Interaktion von EphA4 und

Faktoren außerhalb der transienten proliferativen Zonen ermöglicht. Interessanterweise konnte der Ligand EphrinA5 durch *in situ* Hybridisierung und RT-PCR nicht in kortikalen Zellen detektiert werden, jedoch im sich entwickelnden Thalamus. Die Resultate dieser Arbeit deuten darauf hin, dass EphrinA5 von thalamischen Axonen exprimiert wird und während der frühen Neurogenese an E13,5 durch die thalamokortikale Innervation in die IMZ des sich entwickelnden Neokortex importiert wird, wo der Ligand mit seinem affinen Bindungspartner EphA4 interagiert. Die Ergebnisse deuten an, dass EphrinA5-induziertes EphA4 *forward signaling* die Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen reguliert, indem es den Teilungsmodus und die Austrittsrate aus dem Zellzyklus kontrolliert, wodurch auch die Ausbildung der kortikalen Architektur beeinflusst wird.

## 7 Abstract

During cortical neurogenesis, cortical progenitor cells generate a variety of distinct morphological and functional neuronal subtypes. Many intrinsic and extrinsic factors are already identified, known to regulate the balance between proliferation and differentiation of cortical precursors, influencing the final number and identity of postmitotic neurons. While it is accepted that thalamic innervation affects cortical arealization and neuronal survival at later stages of corticogenesis (O'Leary, 1989; Sato et al., 2012), the impact of thalamic-mediated orchestration of cortical progenitor cell fate regulation is vastly unknown. This study provides evidence for an extracortical regulation of proliferation and identity of cortical progenitor cells by invading thalamic axons, thereby controlling the laminar organization of the neocortex.

Ephrin family members are widely expressed in the embryonic brain, known to be involved in several developmental processes. This study identified the signaling molecule ephrinA5 as a potential regulator of cortical proliferation and cell fate decision, thereby regulating the radial extension of the infra- and supragranular layers (Gerstmann et al., 2010). A loss of function approach revealed alterations in the numbers of apical versus basal progenitors, accompanied by changes in the exit rate during early and later stages of neurogenesis. Analyses of the division mode at early stages of neurogenesis at E13.5 indicated, that radial glia cells divide preferentially asymmetric in ephrinA5-knockout mice, thereby shifting the balance to the production of excitatory projection neurons rather than intermediate progenitor cells.

In this study, EphA4 was identified as the effect-mediating receptor. The receptor is expressed by radial glia cells, exhibiting a radial process that provides an excellent structural scaffold for local interactions of factors localized outside of the proliferative zones with EphA4-receptors of cortical progenitors. Interestingly, using *in situ* Hybridization, RT-PCR, and binding studies with recombinant ephrinA5, the ligand was evident in the embryonic thalamus, but not detectable in cortical cells. The results suggest that thalamic afferences express ephrinA5, thereby import the membrane-bound ligand to the cortex while invading the cortical intermediate zone during early neurogenesis and enable an interaction between ephrinA5 and EphA4.

Taken together, these data suggest that induced EphA4 *forward signalling* by thalamic ephrinA5 regulates the proliferation and cell fate decision of cortical progenitors, thereby controlling the mode of division, the size of the progenitor pool, and the final output of cortical neurons, accompanied by changes in cortical architecture.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aboitiz, F., Montiel, J., Garcia, R.R., 2005. Ancestry of the mammalian preplate and its derivatives: evolutionary relicts or embryonic adaptations? *Rev Neurosci* 16, 359-376.
- Altman, J., Bayer, S.A., 1988. Development of the rat thalamus: III. Time and site of origin and settling pattern of neurons of the reticular nucleus. *J Comp Neurol* 275, 406-428.
- Anderson, R.G., 1998. The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry* 67, 199-225.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., Rubenstein, J.L., 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474-476.
- Angevine, J.B., Jr., Sidman, R.L., 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768.
- Aoto, J., Chen, L., 2007. Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions, *Brain Res*, Netherlands, pp. 72-80.
- Asami, M., Pilz, G.A., Ninkovic, J., Godinho, L., Schroeder, T., Huttner, W.B., Gotz, M., 2011. The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. *Development* 138, 5067-5078.
- Auladell, C., Perez-Sust, P., Super, H., Soriano, E., 2000. The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 201, 169-179.
- Barakat, I., Wittendorp-Rechenmann, W., Rechenmann, R.V., Sensenbrenner, M., 1981. Influence of meningeal cells on the proliferation of neuroblasts in culture. *Developmental neuroscience* 4, 363-372.
- Bayer, S.A., Altman, J., 1991. Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience* 45, 391-412.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blackshaw, S., Scholpp, S., Placzek, M., Ingraham, H., Simerly, R., Shimogori, T., 2010. Molecular pathways controlling development of thalamus and hypothalamus: from neural specification to circuit formation. *J Neurosci* 30, 14925-14930.
- Bolz, J., Gilbert, C.D., 1989. The Role of Horizontal Connections in Generating Long Receptive Fields in the Cat Visual Cortex, *Eur J Neurosci*, pp. 263-268.

- Bolz, J., Uziel, D., Muhlfriedel, S., Gullmar, A., Peuckert, C., Zarbalis, K., Wurst, W., Torii, M., Levitt, P., 2004. Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more. *J Neurobiol* 59, 82-94.
- Book, K.J., Morest, D.K., 1990. Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla. *J Comp Neurol* 297, 55-76.
- Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K.Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., Sestan, N., Molnar, Z., Tarabykin, V., 2008. *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex, *Neuron*, United States, pp. 378-392.
- Cai, L., Hayes, N.L., Takahashi, T., Caviness, V.S., Jr., Nowakowski, R.S., 2002. Size distribution of retrovirally marked lineages matches prediction from population measurements of cell cycle behavior. *J Neurosci Res* 69, 731-744.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W.B., 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development, *J Neurosci*, United States, pp. 6533-6538.
- Calegari, F., Huttner, W.B., 2003. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis, *Journal of cell science*, England, pp. 4947-4955.
- Casanova, M.F., Trippe, J., 2nd, 2006. Regulatory mechanisms of cortical laminar development, *Brain research reviews*, Netherlands, pp. 72-84.
- Castellani, V., Bolz, J., 1996. Developmental strategies underlying the elaboration of cortical circuits. *Revista brasileira de biologia* 56 Su 1 Pt 1, 21-31.
- Castellani, V., Bolz, J., 1997. Membrane-associated molecules regulate the formation of layer-specific cortical circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7030-7035.
- Caviness, V.S., Jr., Frost, D.O., 1980. Tangential organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J Comp Neurol* 194, 335-367.
- Chanas-Sacre, G., Thiry, M., Pirard, S., Rogister, B., Moonen, G., Mbebi, C., Verdiere-Sahuque, M., Leprince, P., 2000. A 295-kDa intermediate filament-associated protein in radial glia and developing muscle cells in vivo and in vitro. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 219, 514-525.
- Chen, B., Schaevitz, L.R., McConnell, S.K., 2005. *Fezl* regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex, *Proc Natl Acad Sci U S A*, United States, pp. 17184-17189.

- Chenn, A., 2008. Wnt/beta-catenin signaling in cerebral cortical development. *Organogenesis* 4, 76-80.
- Chenn, A., McConnell, S.K., 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis, *Cell*, United States, pp. 631-641.
- Chenn, A., Walsh, C.A., 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors, *Science*, United States, pp. 365-369.
- Chumley, M.J., Catchpole, T., Silvany, R.E., Kernie, S.G., Henkemeyer, M., 2007. EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 27, 13481-13490.
- Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Alvarez-Buylla, A., 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3, 1091-1097.
- Cooper, M.A., Son, A.I., Komlos, D., Sun, Y., Kleiman, N.J., Zhou, R., 2008. Loss of ephrin-A5 function disrupts lens fiber cell packing and leads to cataract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16620-16625.
- Costa, M.R., Gotz, M., Berninger, B., 2010. What determines neurogenic competence in glia?, *Brain research reviews*, Netherlands, pp. 47-59.
- Crandall, J.E., Caviness, V.S., Jr., 1984. Thalamocortical connections in newborn mice. *J Comp Neurol* 228, 542-556.
- Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W., Greenberg, M.E., 2000. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103, 945-956.
- Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., Yancopoulos, G.D., 1994. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266, 816-819.
- Davy, A., Gale, N.W., Murray, E.W., Klinghoffer, R.A., Soriano, P., Feuerstein, C., Robbins, S.M., 1999. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes & development* 13, 3125-3135.
- Davy, A., Soriano, P., 2005. Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 232, 1-10.
- de Carlos, J.A., Lopez-Mascaraque, L., Valverde, F., 1996. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16, 6146-6156.
- Dehay, C., Kennedy, H., 2007. Cell-cycle control and cortical development, *Nature reviews. Neuroscience*, England, pp. 438-450.



- Dehay, C., Savatier, P., Cortay, V., Kennedy, H., 2001. Cell-cycle kinetics of neocortical precursors are influenced by embryonic thalamic axons, *J Neurosci*, United States, pp. 201-214.
- Demyanenko, G.P., Siesser, P.F., Wright, A.G., Brennaman, L.H., Bartsch, U., Schachner, M., Maness, P.F., 2011. L1 and CHL1 Cooperate in Thalamocortical Axon Targeting. *Cereb Cortex* 21, 401-412.
- Depaepe, V., Suarez-Gonzalez, N., Dufour, A., Passante, L., Gorski, J.A., Jones, K.R., Ledent, C., Vanderhaeghen, P., 2005. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 435, 1244-1250.
- Deschamps, C., Faideau, M., Jaber, M., Gaillard, A., Prestoz, L., 2009. Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of the mesostriatal pathway. *Exp Neurol* 219, 466-480.
- Deschamps, C., Morel, M., Janet, T., Page, G., Jaber, M., Gaillard, A., Prestoz, L., 2010. EphrinA5 protein distribution in the developing mouse brain, *BMC neuroscience*, p. 105.
- Dihne, M., Bernreuther, C., Sibbe, M., Paulus, W., Schachner, M., 2003. A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J Neurosci* 23, 6638-6650.
- Ellis, C., Kasmi, F., Ganju, P., Walls, E., Panayotou, G., Reith, A.D., 1996. A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene* 12, 1727-1736.
- Emson, P.C., 1993. In-situ hybridization as a methodological tool for the neuroscientist, *Trends in neurosciences*, England, pp. 9-16.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A., Bulfone, A., Kowalczyk, T., Hevner, R.F., 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex, *J Neurosci*, United States, pp. 247-251.
- Farkas, L.M., Haffner, C., Giger, T., Khaitovich, P., Nowick, K., Birchmeier, C., Paabo, S., Huttner, W.B., 2008. Insulinoma-associated 1 has a panneurogenic role and promotes the generation and expansion of basal progenitors in the developing mouse neocortex, *Neuron*, United States, pp. 40-55.
- Farkas, L.M., Huttner, W.B., 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development, *Current opinion in cell biology*, United States, pp. 707-715.
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., Yanagawa, Y., Obata, K., Parnavelas, J.G., 2010. Differential gene expression in migrating cortical interneurons during mouse forebrain development. *J Comp Neurol* 518, 1232-1248.

- Fishell, G., Kriegstein, A.R., 2003. Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance, *Current opinion in neurobiology*, England, pp. 34-41.
- Flanagan, J.G., Vanderhaeghen, P., 1998. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21, 309-345.
- Franco, S.J., Gil-Sanz, C., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S.R., Ramos, C., Muller, U., 2012. Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science* 337, 746-749.
- Frantz, G.D., Weimann, J.M., Levin, M.E., McConnell, S.K., 1994. Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J Neurosci* 14, 5725-5740.
- Fujiwara, T., Kubo, T., Koyama, Y., Tomita, K., Yano, K., Tohyama, M., Hosokawa, K., 2008. mRNA expression changes of slit proteins following peripheral nerve injury in the rat model. *Journal of chemical neuroanatomy* 36, 170-176.
- Furne, C., Ricard, J., Cabrera, J.R., Pays, L., Bethea, J.R., Mehlen, P., Liebl, D.J., 2009. EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 231-238.
- Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Streibhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., Pawson, T., Davis, S., Yancopoulos, G.D., 1996. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis, *Neuron*, United States, pp. 9-19.
- Garel, S., Rubenstein, J.L., 2004. Intermediate targets in formation of topographic projections: inputs from the thalamocortical system. *Trends in neurosciences* 27, 533-539.
- Garey, L.J., Powell, T.P., 1971. An experimental study of the termination of the lateral geniculocortical pathway in the cat and monkey. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 179, 41-63.
- Gauthier-Fisher, A., Lin, D.C., Greeve, M., Kaplan, D.R., Rottapel, R., Miller, F.D., 2009. Lfc and Tctex-1 regulate the genesis of neurons from cortical precursor cells. *Nat Neurosci* 12, 735-744.
- Gensburger, C., Labourdette, G., Sensenbrenner, M., 1986. Influence of meningeal cells on the proliferation and maturation of rat neuroblasts in culture. *Exp Brain Res* 63, 321-330.
- Georgala, P.A., Manuel, M., Price, D.J., 2010. The Generation of Superficial Cortical Layers Is Regulated by Levels of the Transcription Factor Pax6, *Cereb Cortex*.
- Gerstmann, K., Köbe, T., Bolz, J., Zimmer, G., 2010. Ephrin-A5 affects the laminar organisation of the neocortex. *Society for Neuroscience*, 2010 Program No. 636.
- Ghosh, A., Shatz, C.J., 1992. Pathfinding and target selection by developing geniculocortical axons. *J Neurosci* 12, 39-55.

- Gilbert, C., Kelly, J., 1975. The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 81-105.
- Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., Bonhoeffer, F., 1987. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* 101, 697-713.
- Götz, M., Bolz, J., 1992. Formation and preservation of cortical layers in slice cultures. *J Neurobiol* 23, 783-802.
- Götz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, England, pp. 777-788.
- Götz, M., Stoykova, A., Gruss, P., 1998. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex, *Neuron*, United States, pp. 1031-1044.
- Hara, Y., Nomura, T., Yoshizaki, K., Frisen, J., Osumi, N., 2010. Impaired hippocampal neurogenesis and vascular formation in ephrin-A5-deficient mice. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 28, 974-983.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W.B., 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, United States, pp. 3196-3201.
- Haydar, T.F., Ang, E., Jr., Rakic, P., 2003. Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2890-2895.
- Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L., Rakic, P., 2000. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones, *J Neurosci*, United States, pp. 5764-5774.
- Himanen, J.P., Chumley, M.J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W.A., Jeffrey, P.D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D.A., Boyd, A.W., Henkemeyer, M., Nikolov, D.B., 2004. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 7, 501-509.
- Himanen, J.P., Rajashankar, K.R., Lackmann, M., Cowan, C.A., Henkemeyer, M., Nikolov, D.B., 2001. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414, 933-938.
- Holland, S.J., Gale, N.W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., Pawson, T., 1996. Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383, 722-725.
- Holmberg, J., Frisen, J., 2002. Ephrins are not only unattractive. *Trends in neurosciences* 25, 239-243.
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160, 106-154.

- Jakob, H., Beckmann, H., 1994. Circumscribed malformation and nerve cell alterations in the entorhinal cortex of schizophrenics. Pathogenetic and clinical aspects. *Journal of neural transmission. General section* 98, 83-106.
- Jiao, J., Chen, D.F., 2008. Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26, 1221-1230.
- Jung, H., Yoon, B.C., Holt, C.E., 2012. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nature reviews. Neuroscience* 13, 308-324.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., Wojtowicz, J.M., 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis, *Journal of neuroscience methods, Netherlands*, pp. 97-105.
- Knoll, B., Drescher, U., 2002. Ephrin-As as receptors in topographic projections, *Trends in neurosciences, England*, pp. 145-149.
- Knoll, B., Isenmann, S., Kilic, E., Walkenhorst, J., Engel, S., Wehinger, J., Bahr, M., Drescher, U., 2001. Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve. *Mechanisms of development* 106, 119-127.
- Knowles, R.B., Sabry, J.H., Martone, M.E., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Bassell, G.J., Kosik, K.S., 1996. Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* 16, 7812-7820.
- Kolk, S.M., Whitman, M.C., Yun, M.E., Shete, P., Donoghue, M.J., 2005. A unique subpopulation of Tbr1-expressing deep layer neurons in the developing cerebral cortex, *Mol Cell Neurosci, United States*, pp. 538-551.
- Kornack, D.R., Rakic, P., 1998. Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1242-1246.
- Kouprina, N., Pavlicek, A., Mochida, G.H., Solomon, G., Gersch, W., Yoon, Y.H., Collura, R., Ruvolo, M., Barrett, J.C., Woods, C.G., Walsh, C.A., Jurka, J., Larionov, V., 2004. Accelerated evolution of the ASPM gene controlling brain size begins prior to human brain expansion. *PLoS Biol* 2, E126.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., Hevner, R.F., 2009. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* 19, 2439-2450.
- Kriegstein, A.R., Götz, M., 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43, 37-43.

- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A., 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9, *Cell*, United States, pp. 325-337.
- Kullander, K., Klein, R., 2002. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, England, pp. 475-486.
- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Ono, Y., Uno, K.D., Yamada, R.G., Ueda, H.R., Saitou, M., 2006. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 34, e42.
- Labrador, J.P., Brambilla, R., Klein, R., 1997. The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *Embo J* 16, 3889-3897.
- Lackmann, M., Mann, R.J., Kravets, L., Smith, F.M., Bucci, T.A., Maxwell, K.F., Howlett, G.J., Olsson, J.E., Vanden Bos, T., Cerretti, D.P., Boyd, A.W., 1997. Ligand for EPH-related kinase (LERK) 7 is the preferred high affinity ligand for the HEK receptor. *The Journal of biological chemistry* 272, 16521-16530.
- Lee, H.S., Daar, I.O., 2009. EphrinB reverse signaling in cell-cell adhesion: is it just par for the course? *Cell adhesion & migration* 3, 250-255.
- Lee, H.S., Nishanian, T.G., Mood, K., Bong, Y.S., Daar, I.O., 2008. EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nature cell biology* 10, 979-986.
- Lehtinen, M.K., Walsh, C.A., 2011. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 653-679.
- Leighton, P.A., Mitchell, K.J., Goodrich, L.V., Lu, X., Pinson, K., Scherz, P., Skarnes, W.C., Tessier-Lavigne, M., 2001. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 410, 174-179.
- Leingartner, A., Richards, L.J., Dyck, R.H., Akazawa, C., O'Leary, D.D., 2003. Cloning and cortical expression of rat Emx2 and adenovirus-mediated overexpression to assess its regulation of area-specific targeting of thalamocortical axons. *Cereb Cortex* 13, 648-660.
- Liebl, D.J., Morris, C.J., Henkemeyer, M., Parada, L.F., 2003. mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res* 71, 7-22.
- Lopez-Bendito, G., Chan, C.H., Mallamaci, A., Parnavelas, J., Molnar, Z., 2002. Role of Emx2 in the development of the reciprocal connectivity between cortex and thalamus. *J Comp Neurol* 451, 153-169.
- Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., 2003. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nature reviews. Neuroscience* 4, 276-289.

- Lukaszewicz, A., Cortay, V., Giroud, P., Berland, M., Smart, I., Kennedy, H., Dehay, C., 2006. The concerted modulation of proliferation and migration contributes to the specification of the cytoarchitecture and dimensions of cortical areas. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1, i26-34.
- Lund, R.D., Mustari, M.J., 1977. Development of the geniculocortical pathway in rats. *J Comp Neurol* 173, 289-306.
- Mairet-Coello, G., Tury, A., Van Buskirk, E., Robinson, K., Genestine, M., DiCicco-Bloom, E., 2012. p57(KIP2) regulates radial glia and intermediate precursor cell cycle dynamics and lower layer neurogenesis in developing cerebral cortex. *Development* 139, 475-487.
- Marin-Padilla, M., 1971. Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. *Z Anat Entwicklungsgesch* 134, 117-145.
- Marin, O., Rubenstein, J.L., 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon, *Nature reviews. Neuroscience*, England, pp. 780-790.
- Martinez, A., Soriano, E., 2005. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain research. Brain research reviews* 49, 211-226.
- McConnell, J., 1991. Molecular basis of cell cycle control in early mouse embryos. *Int Rev Cytol* 129, 75-90.
- McConnell, S.K., 1989. The determination of neuronal fate in the cerebral cortex, *Trends in neurosciences*, England, pp. 342-349.
- McConnell, S.K., 1995a. Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination, *Neuron*, United States, pp. 761-768.
- McConnell, S.K., 1995b. Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system. *J Neurosci* 15, 6987-6998.
- Meima, L., Moran, P., Matthews, W., Caras, I.W., 1997. Lerk2 (ephrin-B1) is a collapsing factor for a subset of cortical growth cones and acts by a mechanism different from AL-1 (ephrin-A5). *Mol Cell Neurosci* 9, 314-328.
- Merot, Y., Retaux, S., Heng, J.I., 2009. Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex, *Semin Cell Dev Biol*, England, pp. 726-734.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., Ogawa, M., 2001. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons, *Neuron*, United States, pp. 727-741.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., Ogawa, M., 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133-3145.

- Molnar, Z., 2000. Development and evolution of thalamocortical interactions. *European journal of morphology* 38, 313-320.
- Molnar, Z., Adams, R., Blakemore, C., 1998a. Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci* 18, 5723-5745.
- Molnar, Z., Adams, R., Goffinet, A.M., Blakemore, C., 1998b. The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *J Neurosci* 18, 5746-5765.
- Molnar, Z., Blakemore, C., 1995. How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends in neurosciences* 18, 389-397.
- Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M.R., Loschinger, J., Pasquale, E.B., Siever, D.A., Verderame, M.F., Muller, B.K., Bonhoeffer, F., Drescher, U., 1997. Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *Embo J* 16, 1258-1267.
- Morris, N.R., Efimov, V.P., Xiang, X., 1998. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly, *Trends Cell Biol*, England, pp. 467-470.
- Mountcastle, V.B., 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 ( Pt 4), 701-722.
- Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y., Pasquale, E.B., 2003. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling, *Nat Neurosci*, United States, pp. 153-160.
- Nadarajah, B., 2003. Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia* 43, 33-36.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., Pearlman, A.L., 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4, 143-150.
- Nakayama, M., Berger, P., 2013. Coordination of VEGF receptor trafficking and signaling by coreceptors. *Experimental cell research* 319, 1340-1347.
- Niehage, R., 2008. Expressionsanalyse des Ephrin-/Eph Systems im frontalen Gehirn der Maus während der embryonalen und postnatalen Entwicklung. Friedrich Schiller Universität, Jena.
- Nieto, M., Monuki, E.S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S.J., Cunningham, J., Gotz, M., Walsh, C.A., 2004. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 479, 168-180.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases, *Nat Neurosci*, United States, pp. 136-144.

- North, H.A., Zhao, X., Kolk, S.M., Clifford, M.A., Ziskind, D.M., Donoghue, M.J., 2009. Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling, *Development*, England, pp. 2467-2476.
- O'Leary, D.D., 1989. Do cortical areas emerge from a protocortex?, *Trends in neurosciences*, England, pp. 400-406.
- Park, E., Kim, Y., Noh, H., Lee, H., Yoo, S., Park, S., 2013. EphA/ephrin-A signaling is critically involved in region-specific apoptosis during early brain development. *Cell death and differentiation* 20, 169-180.
- Parlapani, E., Schmitt, A., Erdmann, A., Bernstein, H.G., Breunig, B., Gruber, O., Petroianu, G., von Wilmsdorff, M., Schneider-Axmann, T., Honer, W., Falkai, P., 2009. Association between myelin basic protein expression and left entorhinal cortex pre-alpha cell layer disorganization in schizophrenia. *Brain Res* 1301, 126-134.
- Pasquale, E.B., 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour, *Nat Rev Mol Cell Biol*, England, pp. 462-475.
- Pasquale, E.B., 2008. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38-52.
- Peuckert, C., Wacker, E., Rapus, J., Levitt, P., Bolz, J., 2008. Adaptive changes in gene expression patterns in the somatosensory cortex after deletion of ephrinA5, *Mol Cell Neurosci*, United States, pp. 21-31.
- Picco, V., Hudson, C., Yasuo, H., 2007. Ephrin-Eph signalling drives the asymmetric division of notochord/neural precursors in *Ciona* embryos. *Development* 134, 1491-1497.
- Pinto, L., Mader, M.T., Irmeler, M., Gentilini, M., Santoni, F., Drechsel, D., Blum, R., Stahl, R., Bulfone, A., Malatesta, P., Beckers, J., Gotz, M., 2008. Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes--lineage and transcriptome analysis. *Mol Cell Neurosci* 38, 15-42.
- Polleux, F., Dehay, C., Kennedy, H., 1997. The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. *J Comp Neurol* 385, 95-116.
- Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T., Ghosh, A., 2002. Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129, 3147-3160.
- Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., Hevner, R.F., 2008. Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development, *Developmental neuroscience*, Switzerland, pp. 24-32.
- Pratt, T., Quinn, J.C., Simpson, T.I., West, J.D., Mason, J.O., Price, D.J., 2002. Disruption of early events in thalamocortical tract formation in mice lacking the transcription factors Pax6 or Foxg1. *J Neurosci* 22, 8523-8531.



- Price, D.J., Kennedy, H., Dehay, C., Zhou, L., Mercier, M., Jossin, Y., Goffinet, A.M., Tissir, F., Blakey, D., Molnar, Z., 2006. The development of cortical connections, *Eur J Neurosci*, France, pp. 910-920.
- Qiu, R., Wang, X., Davy, A., Wu, C., Murai, K., Zhang, H., Flanagan, J.G., Soriano, P., Lu, Q., 2008. Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B, *The Journal of cell biology*, United States, pp. 973-983.
- Quinn, J.C., Molinek, M., Martynoga, B.S., Zaki, P.A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R.F., West, J.D., Price, D.J., 2007. Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism, *Developmental biology*, United States, pp. 50-65.
- Radakovits, R., Barros, C.S., Belvindrah, R., Patton, B., Muller, U., 2009. Regulation of radial glial survival by signals from the meninges. *J Neurosci* 29, 7694-7705.
- Rakic, P., 1971. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex, *Brain Res*, Netherlands, pp. 471-476.
- Rakic, P., 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145, 61-83.
- Rakic, P., 1977. Genesis of the dorsal lateral geniculate nucleus in the rhesus monkey: site and time of origin, kinetics of proliferation, routes of migration and pattern of distribution of neurons. *J Comp Neurol* 176, 23-52.
- Rakic, P., 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241, 170-176.
- Rakic, P., 1995. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution, *Trends in neurosciences*, England, pp. 383-388.
- Rakic, P., 2005. Less is more: progenitor death and cortical size, *Nat Neurosci*, United States, pp. 981-982.
- Rakic, P., 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology, *Nature reviews. Neuroscience*, England, pp. 724-735.
- Rakic, P., Ayoub, A.E., Breunig, J.J., Dominguez, M.H., 2009. Decision by division: making cortical maps, *Trends in neurosciences*, England, pp. 291-301.
- Reid, C.B., Liang, I., Walsh, C., 1995. Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex, *Neuron*, United States, pp. 299-310.
- Rickmann, M., Chronwall, B.M., Wolff, J.R., 1977. On the development of non-pyramidal neurons and axons outside the cortical plate: the early marginal zone as a pallial anlage. *Anat Embryol (Berl)* 151, 285-307.

- Rosenbaum, J.N., Duggan, A., Garcia-Anoveros, J., 2011. Insm1 promotes the transition of olfactory progenitors from apical and proliferative to basal, terminally dividing and neuronogenic. *Neural development* 6, 6.
- Rouso, D.L., Pearson, C.A., Gaber, Z.B., Miquelajauregui, A., Li, S., Portera-Cailliau, C., Morrissey, E.E., Novitsch, B.G., 2012. Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. *Neuron* 74, 314-330.
- Rudolph, J., Zimmer, G., Steinecke, A., Barchmann, S., Bolz, J., 2010. Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. *Cell adhesion & migration* 4, 400-408.
- Ruediger, T., Zimmer, G., Barchmann, S., Castellani, V., Bagnard, D., Bolz, J., 2013. Integration of opposing semaphorin guidance cues in cortical axons. *Cereb Cortex* 23, 604-614.
- Sansom, S.N., Griffiths, D.S., Faedo, A., Kleinjan, D.J., Ruan, Y., Smith, J., van Heyningen, V., Rubenstein, J.L., Livesey, F.J., 2009. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS genetics* 5, e1000511.
- Sato, H., Fukutani, Y., Yamamoto, Y., Tatara, E., Takemoto, M., Shimamura, K., Yamamoto, N., 2012. Thalamus-derived molecules promote survival and dendritic growth of developing cortical neurons. *J Neurosci* 32, 15388-15402.
- Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J.M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L.M., Seibt, J., Tang, H., Cunningham, J.M., Dyck, R., Walsh, C., Campbell, K., Polleux, F., Guillemot, F., 2004. Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *Embo J* 23, 2892-2902.
- Seuntjens, E., Nityanandam, A., Miquelajauregui, A., Debruyne, J., Stryjewska, A., Goebbels, S., Nave, K.A., Huylebroeck, D., Tarabykin, V., 2009. Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nat Neurosci* 12, 1373-1380.
- Shatz, C.J., Luskin, M.B., 1986. The relationship between the geniculocortical afferents and their cortical target cells during development of the cat's primary visual cortex. *J Neurosci* 6, 3655-3668.
- Shi, W., Levine, M., 2008. Ephrin signaling establishes asymmetric cell fates in an endomesoderm lineage of the *Ciona* embryo. *Development* 135, 931-940.
- Smart, I.H., 1972. Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse diencephalon, as revealed by recording the number, location, and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat* 113, 109-129.

- Smart, I.H., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M., Kennedy, H., 2002. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12, 37-53.
- Song, J., Vranken, W., Xu, P., Gingras, R., Noyce, R.S., Yu, Z., Shen, S.H., Ni, F., 2002. Solution structure and backbone dynamics of the functional cytoplasmic subdomain of human ephrin B2, a cell-surface ligand with bidirectional signaling properties. *Biochemistry* 41, 10942-10949.
- Stein, E., Huynh-Do, U., Lane, A.A., Cerretti, D.P., Daniel, T.O., 1998. Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 1303-1308.
- Stocker, A.M., Chenn, A., 2009. Focal reduction of alphaE-catenin causes premature differentiation and reduction of beta-catenin signaling during cortical development, *Developmental biology*, United States, pp. 66-77.
- Super, H., Soriano, E., Uylings, H.B., 1998. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus, *Brain research. Brain research reviews*, Netherlands, pp. 40-64.
- Takahashi, T., Goto, t., Miyama, S., Nowakowski, S., V.S., C.J., 1999. Sequence of Neuron Origin and Neocortical Laminar Fate: Relation to Cell Cycle of Origin in the Developing Murine Cerebral Wall. *The Journal of Neuroscience*, 19, 10357–10371.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., Jr., 1996. The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neuronogenesis. *J Neurosci* 16, 6183-6196.
- Tamamaki, N., Fujimori, K.E., Takauji, R., 1997. Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17, 8313-8323.
- Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., Gruss, P., 2001. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development* 128, 1983-1993.
- Teissier, A., Waclaw, R.R., Griveau, A., Campbell, K., Pierani, A., 2012. Tangentially migrating transient glutamatergic neurons control neurogenesis and maintenance of cerebral cortical progenitor pools. *Cereb Cortex* 22, 403-416.
- Tiberi, D.A., Carrier, J.F., Beauchemin, M.C., Nguyen, T.V., Beliveau-Nadeau, D., Taussky, D., 2012. Impact of concurrent androgen deprivation on fiducial marker migration in external-beam radiation therapy for prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 84, e7-e12.

- Tischfield, M.A., Engle, E.C., 2010. Distinct alpha- and beta-tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation and survival of neurons: new support for the 'multi-tubulin' hypothesis. *Bioscience reports* 30, 319-330.
- Torii, M., Hashimoto-Torii, K., Levitt, P., Rakic, P., 2009. Integration of neuronal clones in the radial cortical columns by EphA and ephrin-A signalling, *Nature*, England, pp. 524-528.
- Torres, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N., Huganir, R.L., Bredt, D.S., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., 1998. PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21, 1453-1463.
- Tury, A., Mairet-Coello, G., DiCicco-Bloom, E., 2011. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 regulates cell cycle exit, differentiation, and migration of embryonic cerebral cortical precursors. *Cereb Cortex* 21, 1840-1856.
- Uziel, D., Garcez, P., Lent, R., Peuckert, C., Niehage, R., Weth, F., Bolz, J., 2006. Connecting thalamus and cortex: the role of ephrins. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 288, 135-142.
- Uziel, D., Muhlfriedel, S., Bolz, J., 2008. Ephrin-A5 promotes the formation of terminal thalamocortical arbors, *Neuroreport*, England, pp. 877-881.
- Wahl, G.M., Berger, S.L., Kimmel, A.R., 1987. Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods in enzymology* 152, 399-407.
- Wang, D.D., Kriegstein, A.R., 2009. Defining the role of GABA in cortical development. *J Physiol* 587, 1873-1879.
- Wilkinson, D.G., 2001. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nature reviews. Neuroscience* 2, 155-164.
- Yun, M.E., Johnson, R.R., Antic, A., Donoghue, M.J., 2003. EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J Comp Neurol* 456, 203-216.
- Zhang, J., Woodhead, G.J., Swaminathan, S.K., Noles, S.R., McQuinn, E.R., Pisarek, A.J., Stocker, A.M., Mutch, C.A., Funatsu, N., Chenn, A., 2010. Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *Developmental cell* 18, 472-479.
- Zimmer, C., Tiveron, M.C., Bodmer, R., Cremer, H., 2004. Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons, *Cereb Cortex*, United States, pp. 1408-1420.
- Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R., Bolz, J., 2008. Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons, *Eur J Neurosci*, France, pp. 62-73.

- Zimmer, G., Kastner, B., Weth, F., Bolz, J., 2007. Multiple effects of ephrin-A5 on cortical neurons are mediated by SRC family kinases. *J Neurosci* 27, 5643-5653.
- Zimmer, G., Rudolph, J., Landmann, J., Gerstmann, K., Steinecke, A., Gampe, C., Bolz, J., 2011. Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J Neurosci* 31, 18364-18380.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BrdU</b>	Bromdesoxyuridin
<b>BSA</b>	Rinderalbumin
<b>CB</b>	Calbindin
<b>CP</b>	Kortikale Platte
<b>Ctx</b>	Kortex
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
<b>Dig</b>	Digoxigenin
<b>Dil</b>	1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate
<b>div</b>	Tage <i>in vitro</i>
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNAse</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>E</b>	Embryonaltag (E0= Tag der Befruchtung)
<b>efn</b>	Ephrin
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>Fc</b>	Kristallisierbares Fragment der schweren Kette eines IgG-Antikörpers
<b>forw</b>	<i>forward</i>
<b>GABA</b>	$\gamma$ -amino Buttersäure
<b>GBSS</b>	Gepufferte Salzlösung nach Grey
<b>GPI</b>	Glycosyl-phosphatidyl-Inositol
<b>HBSS</b>	Gepufferte Salzlösung nach Hank
<b>hiv</b>	Stunden <i>in vitro</i>
<b>HT</b>	Hybridisierungstemperatur
<b>IgG</b>	Immunglobulin Gamma
<b>IMZ</b>	Intermediärzone
<b>IPC</b>	basale Intermediärzelle
<b>ISH</b>	<i>In situ</i> Hybridisierung

<b>KO</b>	knockout
<b>LGE</b>	Laterale ganglionische Eminenz
<b>LV</b>	Lateraler Ventrikel
<b>MGE</b>	Mediale ganglionische Eminenz
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>MZ</b>	Marginalzone
<b>MZ-Medium</b>	Methylzellulose-haltiges Medium
<b>n</b>	Stichprobenumfang
<b>NBT</b>	Nitroblautetrazoliumchlorid
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>P</b>	Postnataltag (P0=Geburtstag)
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>POA</b>	Präoptisches Areal
<b>PP</b>	Präplatte
<b>rev</b>	<i>reverse</i>
<b>RGC</b>	Radiale Gliazelle
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNAse</b>	Ribonuklease
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>S1</b>	Primärer sensorischer Kortex
<b>SAP</b>	Alkalische Phosphatase aus Schrimps
<b>SEM</b>	Standardfehler
<b>SP</b>	Subplatte
<b>SVZ</b>	Subventrikularzone
<b>Thal</b>	Thalamus
<b>U</b>	Unit
<b>ü.N.</b>	über Nacht
<b>VZ</b>	Ventrikularzone
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	Ziegennormalserum

## 9.2 Verwendete Materialien

### 9.2.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und andere Hilfsmittel

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Binokular	Stereozoom S4E	Leica
Geldokumentationssystem	VisiDoc-It™ Imaging System	UVP
Gelsystem	PerfectBlue	Peqlab Biotechnologie
Heizplatte	HP-LP1	WieseThermo
Hybridisierungssofen	Wärmeschrank UM100	Memmert
Inkubator	HERAcell® 150 CO2	Heraeus
Kaltlichtquelle	KL 1500	Schott
Kryotom	CM1900	Leica
Laminarbox	Hera Safe	Heraeus
<i>Laser scanning</i> Mikroskop	TCS SP5	Leica
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph
Mikroinjektor	CellTram® vario	Eppendorf
Mikroskop	CellObserver	Zeiss
Orbitalschüttler	KS260 basic	IKA
PCR-Maschine	T gradient PCR cycler	Biometra
Puller	PP-83	Narishige
Spannungsquelle	Standard Power Pack P25 T	Biometra
Spektrometer	NanoDrop™1000	Peqlab Biotechnologie
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Tisch-pH-Meter	FiveEasy®	Roth
Tischschüttler	MS1 Minishaker	IKA
Transmissionsmikroskop	BX40	Olympus
Vibrator	VT100S	Leica
Waage	LP620S	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	MilliQ	Millipore
Wasserbad	Memmert WB7	Memmert
Zentrifuge	5804R	Eppendorf

**Tabelle 3:** Liste der verwendeten Materialien und deren Hersteller.

Material	Hersteller
Deckgläser, Objektträger	Mentzel
Insulinspritze (1ml)	Braun Omnifix
Kanülen	Stericon
Kapillare	Science Products
Nylon-Netzfilter (200 µm x 200 µm)	Millipore
PET-Membranen (Porengröße 0,1 µm)	Sabeu GmbH
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH
Rasierklängen	Wilkinson
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Superfrost-Objektträger	Thermo Scientific



**Tabelle 4:** Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Substanz	Hersteller
10X Epitope Retrieval Solution	Leica
Acetanhydrid	Sigma
Agarose	Roth
B12	Invitrogen
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)	Roche
Blocking reagent für ISH	Roche
BrdU	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Serva
Chloralhydrat	Sigma
Chloroform	Roth
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Molecular Probes
D-Glucose	Sigma
Dichlorodimethylsilane	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Thermo Scientific
DMEM	Gibco
dNTPs	Fermentas
EDTA	Boehringer Mannheim
Ehidiumbromid	Roche
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
FBS	Gibco
FgF	Invitrogen
Ficoll 400	Sigma
Formamid	Roth
Glycerin	Sigma
HBSS	Gibco
HEPES	Gibco
Isopropylalkohol	Roth
KCl	Roth
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Roth
Laminin	Sigma
Levamisol	Roth
L-Glutamin	Invitrogen
$\text{LiCl}_2$	Merck
Low-melt Agarose	Sigma
Methylzellulose	Sigma
$\text{MgCl}_2$	Merck
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
Mowiol	Roth
NaCl	Roth
NaCl	Sigma
$\text{NaHPO}_4$	Merck
NaOH	Merck

Substanz	Hersteller
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	Roche
Neurobasal	Gibco
n-Propyl-Gallat	Sigma
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Pepton	Invitrogen
Poly-L-Lysin	Gibco
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
SDS	Roth
Sucrose	Sigma
Tissue Tek®	Sakura
Triethanolamin	Sigma
Trinatriumcitrat	Roth
Tris-Base	Sigma
TritonX	Sigma
Trizol® Reagent	Invitrogen
Trypsin	Sigma
ZNS	Gibco

**Tabelle 5:** Liste der verwendeten rekombinanten Proteine.

Protein	Hersteller
EphrinA5-Fc-Fc	R&D Systems
EphA3-Fc	R&D Systems
Kontroll-Fc	Alexis Biochemicals

### 9.2.2 Verwendete Antikörper

**Tabelle 6:** Liste der verwendeten primären Antikörper, deren Spezifität, Hersteller und die eingesetzte Verdünnung.

Bezeichnung	Spezifität	Hersteller	Endverdünnung
Anti Aspm	<i>Rabbit</i>	Geschenk	1:1000
Anti BrdU	<i>rat</i>	Abcam	1:300
Anti Calbindin	<i>Rabbit</i>	Swant	1:1000
Anti CDP (Cux-2)	<i>Rabit</i>	Santa Cruz	1:200
Anti EphA4	<i>Rabbit</i>	Santa Cruz	1:100
Anti Ki67	<i>rabbit</i>	Leica	1:200
Anti L1	<i>Rabbit</i>	DSHB	1:100
Anti Nestin	<i>Mouse</i>	Millipore	1:100
Anti Otx-1/2	<i>mouse</i>	Chemicon	1:300
Anti Pax6	<i>Mouse</i>	Millipore	1:100
Anti pTyr (PY350)	<i>Rabbit</i>	Santa Cruz	1:50
Anti Tbr1	<i>Rabbit</i>	abcam	1:400
Anti Tbr2	<i>Rabbit</i>	abcam	1:500
Anti $\beta$ III-Tubulin	<i>Rabbit</i>	Sigma	1:300

**Tabelle 7:** Liste der verwendeten sekundären Antikörper, deren Fluoreszenzkonjugate, Hersteller und die eingesetzte Verdünnung.

Bezeichnung	Fluoreszenzkonjugat	Hersteller	Endverdünnung
Anti human IgG	Alexa488	Chemicon	1:1000
Anti moue IgG	Cy2	Jackson	1:500
Anti mouse IgG	Cy3	Jackson	1:500
Anti rabbit IgG	Cy2	Jackson	1:500
Anti rabbit IgG	Cy3	Jackson	1:500
Anti rabbit IgG	Cy5	Molecular Probes	1:1000
Anti rabbit IgG	Dianova	Santa Cruz	1:50
Anti rat IgG	Alexa488	Invitrogen	1:500

### 9.2.3 Verwendete Primer und mRNA-Sonden

**Tabelle 8:** Liste der verwendeten Primer, deren Identifikationsnummer, den detektierten Sequenzbereich und die Primersequenzen in 5'→3' Richtung, sowie die verwendete *Annealing*-Temperatur und die zu erwartende Fragmentlänge.

Gen	Accession Nr.	Sequenzbereich	Primer-sequenz 5'→3'	Annealing-temperatur	Fragmentlänge in bp
βAktin	MGI:87904	1568-1790	Forw CAGCATTGCTTCTGTGTAAATTATG Rev GCACTTTTATTGGTCTCAAGTCAGT	60 °C	223
efnA5	NM_010109.3	3735-4027	Forw CTTTGGAAAATCGCTCCAC Rev AGACAGACCTGCCATTAC	60 °C	210
EphA4	MGI:98277	5606-5773	Forw AAATCAAGCCGTTTCACCAC Rev CGTCCCCTTCACAGATGAAT	60 °C	168
HuD	MGI:107427	3146-3275	Forw TGCACATTGAAGAGGCAAAC Rev TCCAAAACCGAAAAGAGGA	60 °C	130
Ki67	MGI:106035	9055-9497	Forw CCTGTCACTCCAGATCAGAACTC Rev TCTTCATCTCCTTCAGAGTTTTT	60 °C	443

**Tabelle 9:** Liste aller verwendeten Sonden, deren Identifikationsnummer, der detektierte Sequenzbereich und die Sondenlänge. Die Sonden für ephrinA5 und die Eph-Rezeptoren waren in den Vektor pBluescript I KS insertiert und wurden freundlicherweise von Prof. Bolz (Institut für allgemeine Zoologie und Tierphysiologie/Jena) zur Verfügung gestellt. Die Sonde gegen Insm1 war eine Schenkung von Prof. Wieland B. Huttner (MPI/Dresden) und lag in dem Vektor pTOPO-PCRII vor.

Sonde	Gi-Nummer	Insertbereich	Länge des Inserts
ephrinA5	226958660	106 - 637	531 bp
EphA1	12963738	264 – 1171	907 bp
EphA2	6753757	684 – 1573	889 bp
EphA3	25066021	257 – 1253	996 bp
EphA4	6679656	75 – 761	686 bp
EphA5	6679658	903 – 1645	742 bp
EphA6	20893174	227 – 1476	1249 bp
EphA7	20824270	2368 – 2692	324 bp
EphA8	6679662	1120 – 1958	838 bp
EphB2	28498406	1133 – 2018	885 bp
Insm1	30046615	682-1464	783 bp

**Tabelle 10:** Liste der verwendeten Sonden, deren Schmelztemperaturen, sowie die verwendete Schnittstellen und RNA-Polymerasen für die Herstellung der *antisense* und *sense* Sonde. Die Hybridisierungstemperaturen (HT) wurden nach der Formel für RNA-RNA-Hybride wie unter 3.4.6.4 berechnet.

Sonde	HT in °C	Sense- Insertionsrichtung	5' Klonierungsseite =Linearisierung für <i>antisense</i> Sonde	RNA-Polymerase für <i>antisense</i> - Transkription	3' Klonierungsseite =Linearisierung für <i>sense</i> Sonde	RNA-Polymerase für <i>sense</i> - Transkription
ephrinA5	67,6	T3 → T7	KpnI	T3	SacII	T7
EphA1	73,3	T3 → T7	SacII	T7	KpnI	T3
EphA2	75,8	T3 → T7	KpnI	T3	SacI	T7
EphA3	68,2	T3 → T7	KpnI	T3	SacI	T7
EphA4	69,3	T7 → T3	SacI	T7	KpnI	T3
EphA5	66,1	T3 → T7	KpnI	T3	SacI	T7
EphA6	65,7	T3 → T7	KpnI	T3	SacI	T7
EphA7	65,8	T3 → T7	KpnI	T3	SacI	T7
EphA8	75,7	T7 → T3	SacII	T7	KpnI	T3
EphB2	72,2	T7 → T3	SacII	T7	KpnI	T3
Insm1	70,0	T7 → TSP6	KpnI	T7	XhoI	SP6

#### 9.2.4 Medien, Puffer und Stammlösungen

Für Primärkulturen wurden ausschließlich sterile Medien, Puffer und Lösungen verwendet. Dazu wurden die Flüssigkeiten entweder für 20 min bei 212 °C und 2 bar autoklaviert, oder steril filtriert (Porengröße 0,2 µm). Als Lösungsmittel wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

##### 9.2.4.1 Allgemeine Puffer und Stammlösungen

<b>Chloralhydrat</b>	10 % Chloralhydrat in 1X PBS steril filtriert, Lagerung bei RT
<b>PBS</b>	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O pH 7.4, autoklaviert, Lagerung bei 4 °C
<b>PFA</b>	20 % Paraformaldehyd (w/v) in 1X PBS auf 60 °C erhitzt, 2 Tropfen NaOH; pH 7.4, Lagerung bei –20 °C
<b>Sucroselösung</b>	10 % bzw. 30 % Sucrose (w/v) in 1X PBS, Lagerung bei 4 °C

##### 9.2.4.2 Lösungen für Immunhistoistochemie

<b>Blockierlösung</b>	10 % ZNS 4 % BSA 0,2 % TritonX in 1X PBS, Lagerung bei 4 °C
<b>Waschlösung</b>	0,2 % TritonX in 1XPBS, Lagerung bei RT
<b>Mowiol</b>	25 % Mowiol (w/v) 50 % Glycerin 17,5 % n-Propyl-Gallat in 1X PBS, Lagerung bei -20 °C

##### 9.2.4.3 Lösungen und Medien für Primärkulturen

<b>Differenzierungsmedium</b>	10 ng/ml FGF 200 mM L-Glutamin 2 % B27 in Neurobasal, Lagerung bei -20 °C
-------------------------------	--

<b>Einzelzellmedium</b>	10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 g/ml Streptomycin 200 mM L-Glutamin 0,1 % D-Glucose in DMEM mit Natriumpyrovat und Pyridoxin, Lagerung bei 4 °C
<b>GBSS</b>	1,53 mM $\text{CaCl}_2$ 3,66 mM KCl 0,22 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,03 mM $\text{MgCl}_2$ (wasserfrei) 28 mM $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 138 mM NaCl 2,70 mM $\text{NaHCO}_3$ 0,84 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 5,56 mM Glukose pH 7.4, steril filtriert, Lagerung bei 4 °C
<b>Krebsbuffer</b>	126 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1,2 mM $\text{MgCl}_2$ 2,1 mM $\text{CaCl}_2$ 10mM D-glucose 12,5 mM $\text{NaHCO}_3$ pH 7.4, steril filtriert, Lagerung bei 4 °C
<b>MZ-Medium</b>	0,4 % Methylzellulose (m/v) 0,1 % D-(+)-Glucose (m/v) in DMEM, ü.N. bei 4 °C gelöst, steril filtriert 5 % FBS 2,9 % L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 g/ml Streptomycin Lagerung bei 4 °C
<b>Neurobasalmedium</b>	2 % B27 100 U/ml Penicillin 100 g/ml Streptomycin 0.5 % D-Glucose in Neurobasal, Lagerung bei 4 °C
<b>Postholding buffer</b>	10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 100 g/ml Streptomycin in 1X Krebspuffer, Lagerung bei 4 °C
<b>65 % Glukoselösung</b>	32,5 g D-(+)-Glukose in 50 ml Bidest, Lagerung bei -20 °C

#### 9.2.4.4 Puffer und Lösungen für Molekularbiologische Methoden

<b>Ladepuffer</b>	0,5 mM Tris 50 µM EDTA 0,01 % Bromphenolblau (w/v) 5 % Glycerin (v/v) pH 8.0, Lagerung bei RT
<b>LB-Medium</b>	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 1 mM NaOH autoklaviert, Lagerung bei -20 °C Vor Gebrauch Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin
<b>Plasmidpräparation 1</b>	50 mM Glucose 25 mM Tris 10 mM EDTA Lagerung bei RT
<b>Plasmidpräparation 2</b>	0,2 N NaOH 1 % SDS (w/v) Lagerung für max. 4 Wochen bei RT
<b>Plasmidpräparation 3</b>	3 M Kaliumacetat pH 5.2, Lagerung bei RT
<b>TAE</b>	4 mM Tris 2 mM Essigsäure 0,1 mM EDTA pH 8.5, Lagerung bei RT

#### 9.2.4.5 Lösungen für ISH

Für Arbeiten mit RNA wurden die Puffer und Stammlösungen stets mit DEPC-behandeltem bidestilliertes Wasser ( $H_2O_{DT}$ ) angesetzt.

<b><math>H_2O_{DT}</math></b>	1 ml/l DEPC Ü.N. in bidestilliertem Wasser gelöst, autoklaviert, Lagerung RT
<b>Hybridisierungslösung A</b>	0,4 mg/ml Torula RNA 0,1 mg/ml tRNA Lagerung bei -20 °C
<b>Hybridisierungslösung B</b>	1 % Dextransulfat (v/v) 0,05 % FA (v/v) 10 mM EDTA 3 x SCC 1 x Denhardts Lagerung bei -20 °C



<b>MaBT</b>	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 1 % Tween20 (v/v) pH 7.5, Lagerung bei RT
<b>Reaktionspuffer</b>	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9.5, Lagerung bei RT
<b>Reinigungslösung</b>	0,5 % SDS (w/v) 100 mM NaOH Lagerung bei RT
<b>50X Denhardts</b>	1 % Ficoll 400 1 % BSA 1 % Polyvinylpyrrolidon Lagerung bei -20 °C
<b>20x SSC</b>	3M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat pH 7, Lagerung bei RT

### 9.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Es wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Isolation der dissoziierten Einzelzellen und der thalamischen Axone sowie die Anfertigung der cDNA-Bibliotheken wurde von Daniel Pensold durchgeführt. Die Dissertation wurde weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung, noch an einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt. Ich versichere, dass die vorliegende Dissertationsschrift bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in wesentlichen Teilen ähnlicher Form als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht oder einer anderen Hochschule zur Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb eines akademischen Grades vorgelegt wurde. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

---

Katrin Gerstmann

## 9.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner akademischen Laufbahn beruflich und privat unterstützt haben. Es ist nicht leicht, die empfundene Dankbarkeit in Worte zu fassen, da meine Verbundenheit tiefer geht, als es die folgenden Worte je auszudrücken vermögen.

Zuerst möchte ich Dr. Geraldine Zimmer dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gab, dieses inhaltlich und methodisch anspruchsvolle Thema zu bearbeiten. Darüber hinaus bedanke ich mich für ihre fachliche Betreuung, die konstruktiven Vorschläge und interessanten Diskussionen, welche dem Projekt stets neue Impulse gegeben haben. Vor allem aber hat sie mich zur wissenschaftlichen Selbständigkeit erzogen, mir Freiraum für eigene Ideen gegeben und mich ermuntert, auch unkonventionellen Eingebungen nachzugehen. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bolz danke ich im besonderen Maße dafür, dass er in spannenden Vorlesungen und Seminaren mein Interesse für die Neurobiologie geweckt hat. Vielen Dank für die ständige Bereitschaft, mir bei kleineren und größeren Problemen zu helfen. Das kritische Lesen des Manuskripts und die konstruktiven Vorschläge waren stets sehr förderlich für das bearbeitete Projekt.

Bei der Arbeitsgruppe funktionelle Genetik und den Mitarbeitern aus der Humangenetik möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken. Durch die familiäre Atmosphäre im Büro und die gute Laune am Arbeitsplatz habe ich mich sehr wohl bei euch gefühlt. Vielen Dank dafür!

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Judit und Daniel bedanken. Wir waren nicht nur Leidensgenossen, sondern haben auch während langen Versuchstagen und arbeitsreichen Wochenenden viel Spaß zusammen gehabt. Vielen Dank für die zahlreichen Mittags-, Kaffee- und Eispausen, die mir stets die Arbeit versüßt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei der AG Bolz und insbesondere bei Frau Raue bedanken, da sie auch nach meinem Umzug in das neue Labor stets offen für fachliche und technische Probleme waren. Großer Dank gilt vor allem Sandra Clemens, die sich um die EphrinA5-Mäuse und deren Verpaarung gekümmert hat. Außerdem bedanke ich mich bei Judith Rudolph und Kiara Aiello für die tiefe Freundschaft, welche aus dem kollegialen Verhältnis gewachsen ist.

Vielen Dank an all meine Freunde, Volleyballkollegen und Kickergenossen, welche die Zeit in Jena so unvergesslich gemacht haben. Vielen Dank für die sonnigen Nachmittage im Sand, die gemütlichen Runden im Park und die lustigen Spieleabende.

Der größte Dank jedoch gilt meinem Partner Frank und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Oma Helga und Harald. Ihr habt mir stets Kraft und Motivation gegeben meine Ziele zu verwirklichen. Vielen Dank für die bedingungslose Unterstützung, für die Liebe und das Verständnis das ihr mir entgegenbringt, auch wenn es nicht immer einfach mit mir ist.

## 9.7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Katrin Gerstmann
Geburtsdatum	20.02.1986
Geburtsort	Eisenach

### Schulbildung

1992-1996	Hörselberggrundschule Wutha-Farnroda
1996-1998	Realschule Wutha-Farnroda
1998-2004	Ernst-Abbe Gymnasium Eisenach
27.06.2004	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Akademische Laufbahn

2004-2010	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Neurobiologie, Immunologie, Zellbiologie
2009-2010	Diplomarbeit am Institut für allgemeine Zoologie und Tierphysiologie (Friedrich-Schiller-Universität Jena) Titel: „Der Einfluss von EphrinA5 auf die Ausbildung der kortikalen Schichten“
30.09.2010	Diplom (Titel: Diplom-Biologe); Note: sehr gut (1,2)
Seit 2010	Promotion zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium Titel: „Der Einfluss von EphrinA5 auf die Proliferation und Identität kortikaler Vorläuferzellen während der embryonalen Neurogenese“
10.2010-10.2011	Promotion am Institut für allgemeine Zoologie und Tierphysiologie (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
11.2011-05.2013	Promotion am Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Jena)

## 9.8 Publikationsliste

### 9.6.1 Fachartikel

Zimmer G, Rudolph J, Landmann J, **Gerstmann K**, Steinecke A, Gampe C and Bolz J (2011)  
Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of MGE-and POA derived interneurons in the deep and superficial migratory stream.  
Journal of Neuroscience 31 (50):18364-18380.

**Gerstmann K**, Pensold D, Symmank J, Khundadze M, Bolz J and Zimmer G (2014)  
Thalamic afferents influence cortical progenitor levels via ephrinA5/EphA4 interactions.  
(In Revision: Development)

Pensold D, Pommerenke C, Ludewig F, **Gerstmann K**, Salinas-Riester G, Pieler T, Haag N and Zimmer G (2014)  
A NanoString-based approach for single cell transcriptome profiling.  
(Submitted: BMC Research Notes)

Rudolph J, **Gerstmann K**, Zimmer G, Steinecke A and Bolz J (2014)  
Ephrin-B3 reverse signaling regulates the tangential migration of cortical interneurons in the basal telencephalon.  
(Submitted: Frontiers in Neuroscience)

### 9.6.2 Nicht begutachtete Veröffentlichungen

**Gerstmann K**, Köbe T, Bolz J and Zimmer G (2010)

Ephrin-A5 affects the laminar organisation of the neocortex.

Program No. 636. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010

Zimmer G, **Gerstmann K**, Kaestner B and Bolz J (2010)

EphrinA5 affects the laminar organisation of the somatosensory cortex.

International Journal of Developmental Neuroscience 28 (8):655-655.

**Gerstmann K**, Köbe T, Bolz J and Zimmer G (2011)

Ephrin-A5 affects the laminar organisation of the neocortex.

Poster Nr. T16-8A Göttingen, Deutschland: German Neuroscience Society

**Gerstmann K**, Pensold D, Bolz J and Zimmer G (2012)

EphrinA5/EphA4 interactions regulate the cell fate of cortical precursors mediated by neuron to progenitor glial feedback signaling.

Poster Nr. A13 Barcelona, Spanien: Federation of European Neurosciences

Pensold D, **Gerstmann K** Zimmer G and Haag N (2012)

Dissecting the molecular signature of interneuron subtypes at embryonic stages.

Poster Nr. A46 Barcelona, Spanien: Federation of European Neurosciences

Rudolph J, **Gerstmann K**, Zimmer G, Steinecke A and Bolz J (2012)

Differential effects of EphB1 on cortical and striatal Neurons.

Poster Nr. A28 Barcelona, Spanien: Federation of European Neurosciences

Pensold D, Haag N, **Gerstmann K**, Salinas-Riester G, Pieler T and Zimmer G and (2012)

Dissecting the molecular signature of interneuron subtypes at embryonic stages.

Poster Nr. A1 New Orleans: Society for Neuroscience, 2012